

Oxytocin-, Prolaktin-
und Gonadotropinsekretion:
Physiologische und Pathophysiologische
Untersuchungen

Robert Nechwatal

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München

Vorstand : Prof. Dr. E. Buchborn

Oxytocin- , Prolaktin- und Gonadotropinsekretion :
Physiologische und Pathophysiologische Untersuchungen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Robert Nechwatal

aus

Kronach

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

der Universität München

Berichterstatter : Prof. Dr. von Werder

.....

Mitberichterstatter : Prof. Dr. Buchborn

Prof. Dr. Gerlach
.....

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan : Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 9.10.1986

Meinen Eltern

Vorwort:

Mein Dank gilt Prof.Dr. K. von Werder für die Aufnahme in seine endokrinologische Arbeitsgruppe, die Überlassung des Themas und das wohlwollende Interesse an dieser Arbeit.

Danken möchte ich auch den Herren Dr. T. Eversmann und Dr. M.Losa für die wertvolle Kritik, die ich von ihnen erhielt.

Mein spezieller Dank richtet sich an Frl. A. Buchner, ohne deren wertvolle Vorarbeiten die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Darüberhinaus gilt mein Dank Frl. L. Bock und meinem Kommilitonen G. Mehltrittter für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Schließlich danke ich Frau F. Haag und Frau Petri für die Anfertigung der Abbildungen.

Abkürzungsverzeichnis

ADH	= Antidiuretisches Hormon
Ag	= Antigen
Ak	= Antikörper
B / B ₀	= spezifische Bindung
BC	= Bromocriptin
cpm	= counts per minute
E ₂	= Östradiol
FSH	= Follikel - stimulierendes Hormon
GA	= Gesamtaktivität
Gn - RH	= Gonadotropin Releasing Hormon
GRF	= Growth Hormone Releasing Factor
HCG	= Human Chorion Gonadotropin
HVL	= Hypophysenvorderlappen
IHT	= Insulin Hypoglykämie Test
LH	= Luteinisierungshormon
LH - RH	= LH - Releasing Hormon
LPO	= Lactoperoxidase
M	= Mittelwert
MC	= Metoclopramid
OT	= Oxytocin
PIF	= Prolactin Inhibiting Factor
PGF	= Prostaglandin F
PROG	= Progesteron
PRL	= Prolaktin
RIA	= Radioimmunoassay
SE	= Standard Error
SD	= Standard Deviation
TRH	= Thyreotropin Releasing Hormon
TSH	= Thyroidea Stimulierendes Hormon
VK	= Variationskoeffizient

Inhaltsverzeichnis

<u>1.</u>	<u>Einleitung</u>	1
1.1.	Oxytocin	1
1.2.	Prolaktin	3
1.3.	Thema der Arbeit	4
1.3.1.	Problemstellung	4
1.3.2.	Zielsetzung	5
<u>2.</u>	<u>Methodik</u>	6
2.1.	OT - Bestimmung	6
2.1.1.	Chemie	6
2.1.2.	Reagentien	7
2.1.2.1.	Puffer und Lösungsmittel	7
2.1.2.2.	Tracer	7
2.1.2.3.	Standard	9
2.1.2.4.	OT - Antiserum	10
2.1.2.5.	II. Antikörper	10
2.1.2.6.	Extraktion	10
2.1.3.	Vorversuche	10
2.1.3.1.	Wahl des geeigneten Antiserums	10
2.1.3.2.	Kinetik des I.AK	11
2.1.3.3.	Variation der Konzentration des I.AK	12
2.1.3.4.	Spezifität des I.AK	12
2.1.3.5.	II. AK	13
2.1.3.6.	Standard	13
2.1.3.7.	Extraktion	15
2.1.3.8.	Extraktion mittels SEP - PAK - C ₁₈ - Kartuschen	16
2.1.3.9.	Serum - Vorbehandlung	18
2.1.3.10.	Präparation des Nullserums	18
2.1.4.	Ansatzschema des OT - RIA	19
2.1.5.	Assaypräzision und Qualitätskontrolle	19
2.2.	PRL - RIA	19
2.2.1.	Reagentien	19
2.2.2.	Ansatzschema	20
2.3.	LH - RIA	20
2.3.1.	Reagentien	20
2.3.2.	Ansatzschema	20

2.4.	FSH - RIA	21
2.4.1.	Reagentien	21
2.4.2.	Ansatzschema	21
2.5.	E ₂ - RIA	22
2.6.	PROG - RIA	22
2.7.	TSH - RIA	22
<u>3.</u>	<u>Klinische Untersuchungen</u>	23
3.1.	Oxytocin	23
3.1.1.	Verhalten von OT während des ovulatorischen Zyklus	23
3.1.1.1.	Versuchsprogramm	23
3.1.1.2.	Ergebnisse	23
3.1.2.	Stimulation der OT - Sekretion	24
3.1.2.1.	Laktation	24
3.1.2.2.	TRH - , GRF - , IHT - , Drehstuhl - Versuche	26
3.1.2.3.	Seminalplasma	28
3.1.2.4.	Hyperprolaktinämie	29
3.2.	Interaktion zwischen PRL und Gonadotropinen bei der Hyperprolaktinämie	30
3.2.1.	Einfluß von dopaminergen Substanzen auf PRL, LH und FSH .	30
3.2.2.	Pulsatile Gn-RH - Therapie bei Prolaktinomen	33
<u>4.</u>	<u>Diskussion</u>	36
<u>5.</u>	<u>Zusammenfassung</u>	46
<u>6.</u>	<u>Summary</u>	47

1. Einleitung

1.1. Oxytocin

Oxytocin (OT) verdankt seinen Namen - " schnelle Geburt " - seiner stimulierenden Wirkung auf den Uterus. Obwohl eine gesteigerte OT - Sekretion während der Austreibungsphase bewiesen ist und es auch weite Verbreitung als Wehenmittel gefunden hat, herrscht noch weitgehend Unklarheit über seine präzise Rolle während des Geburtsvorganges. Demgegenüber ist die Bedeutung von OT für die Galaktokinese besser untersucht. Folley (37) und Cowie, Forsyth und Hart (22) gebührt der Verdienst ausführlich auf den geschichtlichen Aspekt der Milchejektion und seiner Bedeutung in der Überlieferung durch Mythos und Kunst hingewiesen zu haben. So fand man beispielsweise 5000 - Jahre alte Wandzeichnungen in ägyptischen Tempeln mit Darstellungen von Kühen, die zum Melken anstanden, aber ihre Milch zurückhielten. Primitive Völker kannten in solchen Fällen zwei Strategien, um die Kuh doch zur Milchabgabe zu bringen. Meist genügte es schon, wenn man das Kalb in ihre Nähe brachte. Als Alternative wurde eine uns heute seltsam anmutende Praktik ausgeübt: Während eine Person versuchte die Kuh zu melken, blies eine andere Luft in die Vagina des Tieres. Diese Manipulation findet sich schon vor 2400 Jahren beim griechischen Geschichtsschreiber Herodot und man kann mit Recht von dem wohl ältesten Beispiel angewandter Neuroendokrinologie sprechen. Heute steht diese uns wie ein primitives Ritual erscheinende Praktik auf sicherer physiologischer Grundlage, denn es ist nachgewiesen, daß vaginale Stimulation zur OT - Freisetzung führt. (27, 101).

Besonders in den letzten Jahren haben sich eine Vielzahl von Daten angesammelt, die zum Verständnis der Physiologie dieses Hormons und seiner Stellung innerhalb der Reproduktionsendokrinologie beigetragen haben. OT wird wie ADH in den Kerngebieten des nucleus supraopticus und paraventricularis des Hypothalamus gebildet. Bargmann und Scharrer führten das inzwischen allgemein anerkannte Konzept der Neurosekretion ein, welchem zufolge beide Hormone entlang den Axonen vom Hypothalamus in den Hypophysenhinterlappen transportiert werden, wo sie in Form von Granula gespeichert und bei Bedarf in den Pfortaderkreislauf der Hypophyse abgegeben werden (7). Sowohl OT als auch ADH sind dabei an zwei verschiedene intragranuläre Trägerproteine - die sogenannten Neurophysine - gebunden, die mit beiden zusammen ins Blut sezerniert werden (102). OT, ADH und die Neurophysine sollen durch schrittweise

Proteolyse aus einem gemeinsamen Prohormon entstehen (104).Dies wird durch immunhistochemische Untersuchungen von Brownstein gestützt, der auch den Versuch unternommen hat die ungefähre Struktur eines " Propressophysins " anzugeben (13).Die Freisetzung von OT aus den Speichergranula erfolgt durch den Prozess der Exozytose, wodurch es aus dem terminalen Axon in das Kapillarnetz der Hypophyse gelangt.Oxytocin wird während der Schwangerschaft von der spezifischen Oxytocinase abgebaut, die plazentaren Ursprungs ist (116).Ferner wird es von der laktierenden Mamma inaktiviert (67).

Die beiden am längsten bekannten physiologischen Stimuli für die Freisetzung von Oxytocin sind der Saugreiz (28) und die Dilatation von Cervix und Vagina während der Geburt, ein Vorgang, der auch als " Ferguson - Reflex " bekannt ist (32).Tindal weist darauf hin, daß die OT - Sekretion durch psychische Faktoren leicht konditionierbar ist und durch Äthanol und emotionalen Stress inhibiert werden kann (125).Weitere Möglichkeiten um Oxytocin zu stimulieren sind die Zufuhr von Östrogenen (2) oder Prostaglandinen (44).Die beiden physiologischen Hauptwirkungen von OT bestehen zum einen in der Kontraktion der glatten Myoepithelzellen der Ausführungsgänge der weiblichen Brustdrüse, was zur Milchejektion führt, Zum anderen löst OT am nicht schwangeren Uterus Kontraktionen aus, eine Wirkung, die durch Östrogene gesteigert werden kann, durch Progesteron jedoch herabgesetzt wird.Bei der Geburt spielt es eine wichtige, jedoch nicht lebenswichtige Rolle bei der Expulsion des Fetus.Durch die Beschleunigung der Austreibungsphase wird das Risiko fetaler Asphyxie vermindert.Wie aus klinischen Erfahrungen hervorgeht kommt es jedoch als alleiniger geburtsauslösender Faktor nicht in Frage.So können beispielsweise hypophysektomierte Frauen normale Wehentätigkeit aufweisen.(65).Gegenstand intensiver Diskussion sind eine Reihe von zusätzlichen Wirkungen, die OT zugeschrieben werden.Es soll bei der Regulation des weiblichen Zyklus eine Rolle spielen (2,83,84) und beim Mann bei der Ejakulation und der Spermienaszenion ursächlich beteiligt sein (92,112).Das Konzept, demzufolge OT als Releasing- Faktor für Hormone der Adenohypophyse in Frage komme, erstmals von Benson und Folley 1957 postuliert und durch die nachfolgende Entdeckung verschiedener hypothalamischer Releasing-Faktoren unwahrscheinlich geworden, hat durch neuere Untersuchungen wieder Unterstützung erhalten.(43).Darüberhinaus wird OT als Neurotransmitter für Nervenzellen , die vom nucleus supraopticus und paraventricularis ausgehen und zu höheren Zentren führen, diskutiert (117,143).Schließlich soll OT inhibitorischen Einfluß auf das Gedächtnis haben (127,140,143).

1.2. Prolaktin

Beim humanen Prolaktin handelt es sich um ein einkettiges Peptidhormon mit 198 Aminosäuren und drei Disulfidbrücken (110). Die Initiation und Aufrechterhaltung der Laktation ist die einzige bekannte Funktion von Prolaktin beim Menschen. Während der Schwangerschaft kommt es zu einem kontinuierlichen PRL - Anstieg. Dieser ist auf die stimulierende Wirkung von Östrogenen, welche während der Schwangerschaft vermehrt sezerniert werden, auf die laktotrophen Zellen des Hypophysenvorderlappens zurückzuführen. Bis heute ist keine physiologische Bedeutung von PRL beim Mann bekannt. Die Sekretion unterliegt einer Vielzahl von externen Stimuli wie dem Saugreiz, emotionalem und psychischem Stress sowie einem internen Rhythmus, einem Wach - und Schlaf - Zyklus, der höhere Werte mit Beginn der Schlafphase aufweist (133). Im Gegensatz zum Sekretionsmodus aller anderen Hormone des Hypophysenvorderlappens ist die Steuerung durch den Hypothalamus die einer tonischen Supprimierung durch den PIF, den " pro - lactin inhibiting factor ". Obwohl die exakte Struktur des PIF noch nicht aufgeklärt worden ist, spricht vieles dafür, daß der Neurotransmitter Dopamin mit diesem identisch ist. So wird die Prolaktin - Sekretion durch L-Dopa und Dopaminagonisten gehemmt. Eine Hyperprolaktinämie wird nach Gabe des Dopaminantagonisten Metoclopramid, aber auch nach Verabreichung von Neuroleptika und Rauwolfiaalkaloiden beobachtet (136). Auch TRH induziert einen PRL - Anstieg und findet Verwendung als Stimulationstest. Pathophysiologisch spielt die Hyperprolaktinämie bei beiden Geschlechtern eine Rolle als Ursache eines hypothalamischen Hypogonadismus. Beim Gesunden hemmt PRL über eine Steigerung des hypothalamischen Dopaminumsatzes seine eigene Freisetzung. Bei der Hyperprolaktinämie, etwa infolge eines PRL - produzierenden Hypophysentumors, ist die hypothalamische Dopamin - konzentration erhöht (106). ohne, daß dadurch die autonome hypophysäre PRL - Sekretion beeinflusst wird. Jedoch wird die endogene LH - RH - Freisetzung gestört, was zu einem Verlust der sekretorischen Pulsatilität von LH und letztlich zu einem hypothalamischen Hypogonadismus führt (110). Man unterscheidet bei den PRL - produzierenden Tumoren zwischen Mikro- und Makro - Prolaktinomen, bei denen es sich sehr wahrscheinlich um zwei verschiedene Krankheitsbilder handelt. Mikro-Prolaktinome kommen prak -

tisch ausschliesslich bei der Frau vor, sind östrogenabhängig und weisen keine besondere Wachstumstendenz auf. Makro - Prolaktinome treten bei beiden Geschlechtern gleich häufig auf und zeichnen sich durch eine ausgeprägte Proliferationstendenz aus (36,137,139).

1.3. Thema der Arbeit

1.3.1. Problemstellung

Aufgrund des schwierigen OT - Assays liegen bisher nur wenige Untersuchungen zur Physiologie von OT vor. Die Laktation ist der am besten untersuchte Stimulus; es kommt dabei zur Ausschüttung sowohl von OT als auch von PRL. (36). Auch TRH soll während des Stillvorgangs freigesetzt werden (26). In den letzten Jahren häuften sich Daten, die OT weitere spezifische Funktionen innerhalb der Reproduktionsendokrinologie zuschreiben. Untersuchungen an Tieren (103,108,114) und Menschen (2,83,84) weisen auf eine Rolle bei der Regulation des weiblichen Zyklus hin. Beim Mann gibt es Hinweise dafür, daß OT bei den Vorgängen um die Ejakulation und Spermienaszension beteiligt ist (55,61,112,126). Durch Tierversuche ist bekannt, daß OT bei der Ratte PRL in vitro und in vivo stimuliert (76). Lumpkin vertritt wie Gibbs (43) die These, daß OT als hypothalamisches Releasing- Hormon eine Rolle spielt. Inwieweit OT bei der Entstehung eines hyperprolaktinämischen Hypogonadismus Bedeutung zukommt ist offen. Die Gonadotropinsekretion bei Hyperprolaktinämie ist intensiv untersucht worden, aber die vorliegenden Daten weisen zum Teil untereinander erhebliche Diskrepanz auf. So findet man neben einer fehlenden Stimulierbarkeit (100), einen überschießenden Anstieg der Gonadotropine (85) sowie eine Verschiebung des LH/FSH - Quotienten (66) nach Gabe von LH - RH bei hyperprolaktinämischen Patienten. Auch die Befunde hinsichtlich einer dopaminergen Regulation der Gonadotropine zeigen keine Übereinstimmung. Nach Applikation des Dopaminantagonisten Metoclopramid fanden Quigley et al. eine Stimulation der LH - Sekretion (98) und folgerten daraus, daß in der Pathogenese der Hyperprolaktinämie ein erhöhter dopaminerger Tonus eine zentrale Rolle spiele. Diese Ergebnisse konnten jedoch von anderer Seite nicht bestätigt werden. (75). Eine Erklärung der diskrepanten Befunde ergibt sich, wenn man das Ausmaß des Östrogen- Defizits, die Dauer der Hyperprolaktinämie und die Höhe der PRL - Spiegel berücksichtigt (137).

1.3.2. Zielsetzung

Meine Arbeit gliedert sich in zwei Hauptteile, nämlich einen methodischen und einen klinischen Teil.

Wesentlicher Bestandteil der Methodik ist der OT - RIA. Hier galt es einen RIA aufzubauen, mit dem auch basale Konzentrationen um 1 - 2 pg/ml gemessen werden können. Die größte Schwierigkeit liegt dabei in der Wahl eines spezifischen Antikörpers, denn OT besitzt als Oktapeptid nur eine schwache Aktivität als Immunogen. Andererseits darf der AK keine Kreuzreaktivität mit ADH aufweisen, das sich von OT nur durch zwei Aminosäuren unterscheidet. Eine OT - Bestimmung im Serum ohne Extraktion ist wegen bestehender Interferenz mit anderen Serumproteinen nicht möglich. Es mußte also ein reproduzierbares Extraktionsverfahren und ein praktikabler Weg zur Inaktivierung der OT - spaltenden Serumpeptidasen sowie der spezifischen Oxytocinase gefunden werden. Auch die Methodik für die Bestimmung der übrigen Reproduktionshormone wird dargestellt.

Im zweiten, klinisch orientierten Teil ging es zunächst darum physiologische Grundlagen für die OT - Sekretion zu erarbeiten. Zur Untersuchung der OT - Spiegel während des weiblichen Zyklus wurde einer Gruppe von Frauen mit normaler Ovarialfunktion täglich Blut abgenommen und OT, PRL, LH, FSH, E_2 und PROG während des Zyklus bestimmt. Die TSH, PRL und OT - Sekretion nach TRH- und GRF- Applikation wurden überprüft. Ein Seminalplasma - Pool wurde auf das Vorkommen von OT getestet, um so weitere Hinweise für eine physiologische Funktion beim Mann zu bekommen.

Abschließend führte ich einige Untersuchungen zur Pathophysiologie der Hyperprolaktinämie durch. OT, PRL, LH und FSH wurden bei zwei hyperprolaktinämischen Patientinnen vor Therapiebeginn, nach Gabe des Dopaminantagonisten Metoclopramid und nach Therapie mit dem Dopaminagonisten Bromocriptin bestimmt. Bei beiden Patientinnen sollten im Verlauf der Therapie ebenso wie bei zwei weiteren, die durch LH - RH (Zyklomat, Ferring, Kiel) behandelt wurden, ovulatorische Zyklen ausgelöst werden. Hierbei erhofften wir uns Aufschluß einerseits über eine Beteiligung von OT bei der Pathogenese des hyperprolaktinämischen Hypogonadismus und andererseits über die dabei zu beobachtende Störung der Gonadenfunktion.

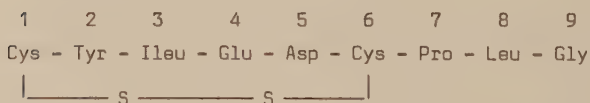
2. Methodik

2.1. OT - Bestimmung

Nachdem Yalow und Berson mit der radioimmunologischen Messung von Insulin die Grundlage zur Bestimmung kleinster Hormonkonzentrationen geschaffen hatten (141), gelang es 1965 zum ersten Mal Antikörper gegen OT zu erzeugen (45). Die Herstellung hochspezifischer Antisera blieb jedoch ein Problem und so sind bis heute erst relativ wenige Radioimmunoassays beschrieben, die den herkömmlichen Bioassays an Spezifität und Reproduzierbarkeit überlegen sind (19,24,64,94,107). In praxi erwies sich jedoch keine der genannten Methoden als ganz zufriedenstellend. Aufgrund der sehr niedrigen Plasma - OT - Spiegel von etwa 1-2 pg/ml (2,26) reicht meist die untere Nachweisgrenze nicht aus um unstimulierte, basale Werte im Serum bestimmen zu können. Dazu kommt, daß aufwendige Extraktionsverfahren angewandt werden müssen um Serumproteine zu entfernen, die unspezifisch an den Antikörper binden. Bei manchem Procedure wird dabei von Extraktionsverlusten bis zu 60 % berichtet (24).

Bei dem im folgenden beschriebenen OT - RIA handelt es sich um einen Assay, dessen Sensitivität mit 1 - 2 pg/ml so optimiert wurde, daß sie im Bereich basaler Konzentrationen lag, und OT nach physiologischen Stimuli wie dem Saugreiz zweifelsfrei im Serum gemessen werden konnte.

2.1.1. Chemie



Rechnet man die beiden Cysteinmoleküle in Position 1 und 6, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind als ein Cystinmolekül, so ist Oxytocin ein Oktapeptid. Die Struktur des OT hat sich im Laufe der biochemischen Evolution aus Arginin - Vasotocin entwickelt, dem einzigen neurohypophysären Hormon aller niederen Wirbeltiere (110). Aus einer einzigen Punktmutation in Position 8 - Leucin anstelle von Arginin - entsteht so OT, und tritt Phenylalanin in Position 3 an die Stelle von Isoleucin, so ergibt sich die Struktur des ADH.

2.1.2. Reagentien

2.1.2.1. Puffer und Lösungsmittel

0,05 m Sörensen - Phosphatpuffer : pH 7,5

89 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in 1000 ml aqua bidestillata lösen ;

13,62 g KH_2PO_4 in 200ml aqua bidestillata lösen ;

Mit letzterer Lösung pH auf 7,5 einstellen.

Der so hergestellte 0,5 m PO_4 - Puffer wird dann noch mit aqua bidestillata 1 : 10 verdünnt.

OT - Assay Puffer : EDTA - Puffer + 0,05 % Albumin

In 100 ml 0,05 m PO_4 - Puffer werden 50 mM = 1,85 g EDTA und 0,05 g humanes Serumalbumin gegeben und gemischt

2.1.2.2. Tracer

OT wurde nach der Lactoperoxidase - Methode (LPO) markiert. Folgende Reagentien gelangten dabei zur Anwendung:

Elutionspuffer:

0,5 m Ammoniumacetatpuffer pH 4,0

1) 60 g Eisessig ad 2000 ml aqua bidestillata pH 7,0

2) 38,5 g Ammoniumacetat ad 1000 ml aqua bidestillata pH 7,0

der pH von Lösung (1) wird mit Lösung (2) auf pH 4,0 eingestellt

J^{125}

0,5 mCi J^{125} werden in 100 μl 0,5 m Phosphatpuffer pH 7,5 gelöst

OT - Standard

Als Markierungsstandard verwendeten wir synthetisches Oxytocin der Firma Sandoz (Charge Nr. 74006) je 200 IU/ml. Pro Markierung benötigten wir 2 μg = 5 μl .

LPO (Boehringer):

Stammkonzentration 10 mg / 2ml. 10 µl LPO wurden in 1ml 0,5 m Ammonium-acetatpuffer pH 5,0 gelöst. 25 µl dieser Lösung mit einer spezifischen Aktivität von 140 IU / vial bei 30° C wurden eingesetzt.

H₂O₂:

30% H₂O₂ als Cofaktor der Oxidation wurde in einer Arbeitsverdünnung von 1 : 2000 eingesetzt. Hierzu wurde 0,1 ml H₂O₂ mit 200 ml aqua bi - destillata verdünnt.

Sephadex C 50, 0,9 * 60 cm Säule :

Säulenpräparation : 2,5 g CM - Sephadex C 50 - Gel wurden in 300 ml Elutionspuffer gelöst, 24 Stunden quellen gelassen und danach mit der Wasserstrahlpumpe entgast. Die Spitze der Säule wurde mit Glaswolle gefüllt und einigen Glaskugeln überschichtet. Nach dem Mischen des gequollenen Gels mit einem Spatel konnte die Säule gefüllt werden. Es war darauf zu achten, daß sich das Gel während des Füllens nie ganz absetzte, da die Säule sonst inhomogen wurde. Der obere Rand des Gels sollte immer vom Elutionspuffer bedeckt sein, und die Säule mußte alle ein bis zwei Minuten gedreht werden. War die gewünschte Höhe erreicht, so wurde die Säule schließlich mit 100 bis 200 ml Elutionspuffer gewaschen, wobei die optimale Durchflußgeschwindigkeit einreguliert werden konnte.

Markierungsablauf:

- 1) 15 µl J¹²⁵
- 2) 5µl OT - Standard
- 3) 25 µl LPO gelöst
- 4) 10 µl H₂O₂ -Verdünnung

Die Reagentien unter Punkt 1) bis 3) wurden gemischt und die Reaktion bei Raumtemperatur durch Zugabe von 10µl H₂O₂ 0,02% in Gang gebracht. Das so hergestellte Gemisch 5 Minuten lang geschüttelt; danach noch einmal 10 µl H₂O₂ zugegeben und wieder 10 Minuten geschüttelt. Schließlich wurde mit zweimal 200µl 0,5 m Ammoniumacetat- Puffer pH 4 verdünnt und das Markierungsgemisch wurde auf die Kationenaustauschssäule aufgetragen, welche zuvor wie beschrieben mit Elutionspuffer equilibriert worden war. Die Elution erfolgte mit 0,5 m Ammoniumacetat - Puffer pH 4. Wurde die Durchflußrate so langsam wie möglich eingestellt (ca. 25 Tropfen pro Stunde) dann war die Trennung von markiertem und monojodiertem OT um

so schärfer. Gesammelt wurden 100 Fraktionen (ca. 40 Tropfen pro Fraktion entsprechen 1,2 ml / Glas). Monojodiertes OT wurde zwischen den Fraktionen 50 und 70 eluiert (Abb. 1). In diese Röhrchen wurde jeweils 50 µl bovines Serumalbumin vorgelegt.

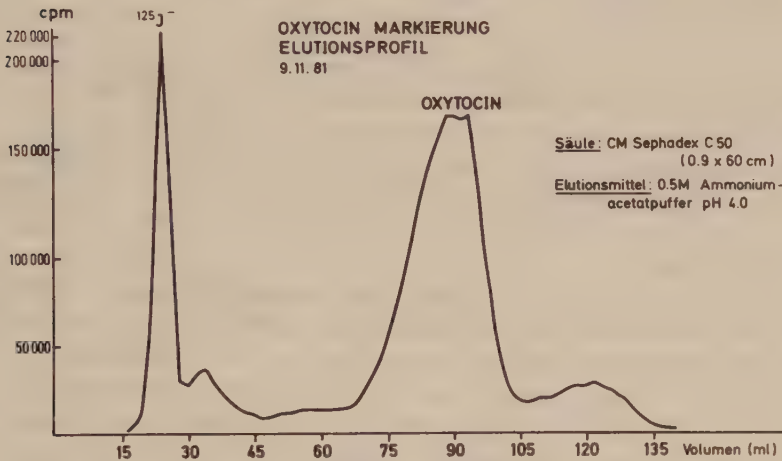


Abbildung 1 : Elutionsprofil von $^{125}\text{J}^-$ OT über Sephadex C 50 (0,9x60 cm)

Die maximale Bindung von monojodiertem OT bei AK - Überschuß lag bei etwa 65 %. Der Tracer hatte bei dem hier beschriebenen repräsentativen Elutionsprofil eine Aktivität von 155 mCi pro µg OT . Unser Tracer war bei Lagerung bei 4 °C zwei Monate verwendungsfähig.

2.1.2.3. Standard

Als Standard verwendeten wir synthetisches Oxytocin der Firma Ferring Charge Nr. 750919 (1µg = 385 IU), welches mit 1 ml Essigsäure gelöst, in 10 µl-Portionen in silikonisierte Reagenzgläser fraktioniert und bei - 20 ° C gelagert wurde. 10 µl der Stammlösung wurden mit Assaypuffer (EDTA + 0,05 % Albumin, siehe: 2.1.2.1.) 1 : 100 verdünnt, was zugleich die Anfangsverdünnung der OT - Standardkurve ist. Ausgehend von 100 pg / ml ließ sich eine geometrische Verdünnungsreihe aufstellen mit den für den OT - RIA benötigten Konzentrationen : 100 - 50 - 25 - 12,5 - 6,25 - 3,13 - 1,56 - 0,78 - 0,39 pg / ml

2.1.2.4. OT - Antiserum

Es standen uns insgesamt vier Antikörper zur Verfügung. Aufgrund der folgenden Vorversuche verwendeten wir einen von PD Lang (Heidelberg) erhaltenen AK, der mit einer Verdünnung von 1 : 200.000 eingesetzt werden konnte.

2.1.2.5. II. Antikörper

Die Bound / Free - Trennung mittels II.AK (s.h: 2.1.3.5.) erwies sich der von anderen Autoren bevorzugten Trennung mittels charcoal (107) als überlegen. Wir verwendeten II.AK der Firma Paesel als unverdünntes Anti - Kaninchen - Gamma - Globulin. Dieses wurde mit EDTA - Puffer + 0,5 % Albumin auf die Gebrauchsverdünnung von (1 : 50) gebracht.

2.1.2.6. Extraktion

Zur Serum - Extraktion von OT verwendeten wir eisgekühltes Aceton (- 20 °C). 2 ml Serum wurden unter dauerndem Schütteln auf dem Vortex mit 3ml Aceton gemischt. Das Gemisch wurde dann 20 Minuten lang bei 4 °C mit 4000 Upm zentrifugiert und das Überständige Plasma-Aceton- Gemisch im Vortex- Evaporator bei 37 °C eingedampft. Nachdem das Aceton weitgehend eingedampft war, wurden die Proben ca. eine Stunde bei - 80 °C tiefgefroren und anschließend bis zur völligen Trocknung im Lyophilisator über Nacht lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde mit 750 µl Assaypuffer resuspendiert und von dem gelösten Extrakt wurden jeweils 200 µl in den RIA eingesetzt.

2.1.3. Vorversuche

Zur Standardisierung des OT - Assays führten wir folgende Vorversuche durch: Es mußten die Verdünnungs - und Bindungskinetik verschiedener Antiseren getestet werden, die Bound/Free - Trennung und die Extraktion mußten optimiert und der Abbau des OT durch unspezifische Serumpeptidasen sowie der spezifischen Oxytocinase inhibiert werden. Schließlich war ein geeignetes Nullserum für die Eichkurve herzustellen.

2.1.3.1. Wahl des geeigneten OT - Antiserums

Eine der wesentlichen Voraussetzungen um die Sensitivität und damit die untere Nachweisgrenze eines RIA 's zu verbessern, ist die Optimierung der

Verdünnung des Antikörpers, damit auch bei hoher Verdünnung noch eine ausreichende spezifische Bindung erreicht wird. Für dieses Ziel standen uns insgesamt vier Antiseren zur Verfügung : Ferring (K 19780510), Prof. Schams (Weihenstephan) und zwei von PD Lang (Heidelberg). Die folgende Tabelle veranschaulicht das unterschiedliche Bindungsverhalten der vier AK. Bei der folgenden Versuchsreihe wurden Tracer und I.AK drei Tage inkubiert und die Bound / Free - Trennung erfolgte mit II.AK (Paesel 1 : 50).

Tabelle 1: Bindungsverhalten der vier OT - Antiseren

1) I. AK (1) (PD Lang)

Verdünnung	1:1000	1:10.000	1:20.000	1:40.000	1:80.000	1:160.000
B/B ₀ (%)	67	61	57	51	43	28

2) I.AK (2) (PD Lang)

Verdünnung	1:4000	1:8000	1:16.000	1:32.000
B/B ₀ (%)	45	34	26	17

3) I.AK (Fa. Ferring)

Verdünnung	1:1000	1:2000	1:4000	1:8000	1:16.000
B/B ₀	56	46	36	26	15

4) I.AK (Prof.Schams)

Verdünnung	1:20.000
B/B ₀ (%)	22

Mit dem I.AK (1) von PD Lang stand uns demnach ein geeigneter Antikörper zur Verfügung, der nach Optimierung aller Reaktionsbedingungen schließlich mit einer Verdünnung von 1:200.000 eingesetzt werden konnte.

2.1.3.2. Kinetik des I.AK

Die Bindungskinetik wurde bei einer Temperatur von 4 °C über fünf Tage mit einer I.AK - Verdünnung von 1: 200.000 untersucht. Die spezifische Bindung B/B₀ stieg linear bei Variation der kalten Vorinkubation bis zu einem Maximum von 28 % nach vier Tagen. Auch bei längerer Inkubation erfolgte keine Zunahme von B/B₀ mehr. Deshalb setzten wir die Zeit der kalten Vorinkubation auf vier Tage fest.

2.1.3.3. Variation der Konzentration des I.AK

Um eine für den RIA optimale spezifische Bindung von 25 % zu erreichen, mußten wir wie aus Abb. 2 hervorgeht den I.AK in einer Verdünnung von 1 : 200.000 einsetzen.

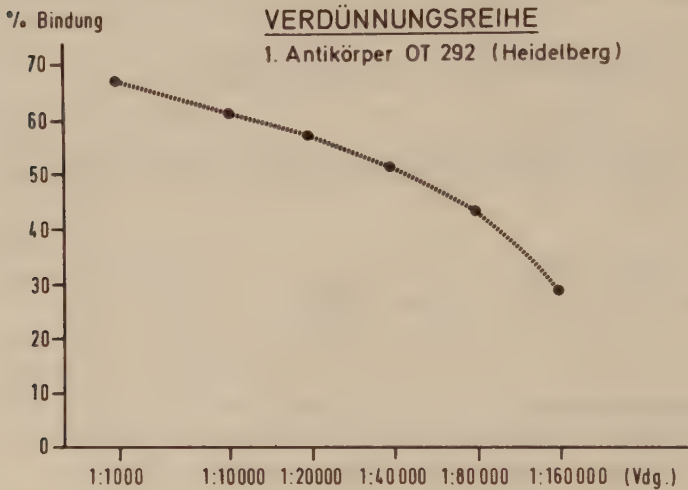
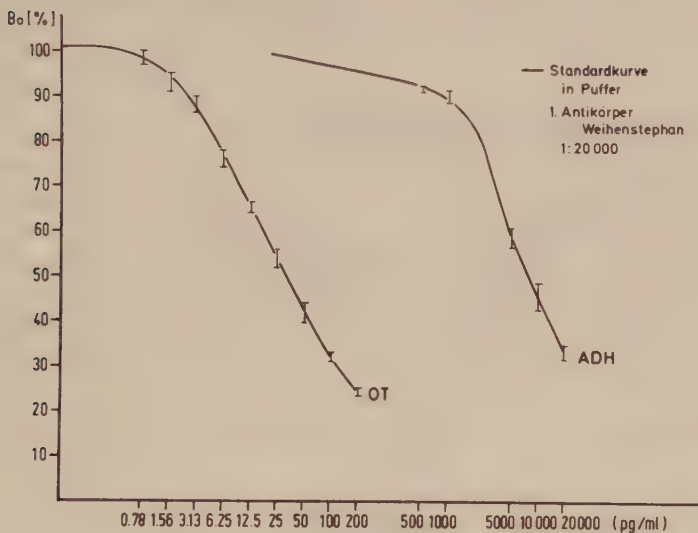


Abb. 2 : Spezifische Bindung B/B_0 in Abhängigkeit der Verdünnung des I.AK

2.1.3.4. Spezifität des I.AK

Die Spezifität des I.AK gegenüber ADH, das sich von OT nur durch zwei Aminosäuren unterscheidet, untersuchten wir durch die Zugabe von ADH in Konzentrationen zwischen 1 - 20 ng und nachfolgendes Einsetzen in den RIA. Aus der folgenden Abbildung ergibt sich eine Kreuzreaktivität von 0,6 %, welche praktisch zu vernachlässigen ist.

Abb. 3: Kreuzreaktivität zwischen ADH und OT



2.1.3.5. II.AK

Wir verwendeten zur Bound/Free - Trennung die Doppelantikörper-Technik, durch die sich die Sensitivität des Assays erhöhen läßt. Dieses Trenverfahren beruht darauf, daß es die immunologischen Eigenschaften eines zweiten Antikörpers ausnützt, der sich gegen die Gamma-Globuline der Tierart richtet, aus der der erste Antikörper gewonnen wurde. In unserem Fall handelt es sich um speziesspezifische Gamma-Globuline gegen die Kaninchen-Globuline des I.AK (Fa. Paesel). In einer Versuchsreihe zeigte sich, daß bei Variation der Verdünnung des II.AK und bei Konstanz aller übrigen Inkubationsbedingungen die Ausfällung bei einer Verdünnung des II.AK von 1 : 50 optimal im Plateau erfolgt. Wir entschieden uns deshalb dafür den II.AK mit dieser Konzentration für die Bound / Free - Trennung zu verwenden.

2.1.3.6. Standard

Als OT -Standard standen uns synthetisches OT der Firmen Ferring (Charge-Nr. 750916), Sandoz (Charge -Nr. 74006) und Ciba - Geigy (Synthocinon)

zur Verfügung. Wir verglichen die drei Standardkurven unter Verwendung des I.AK (PD Lang 1 : 250.000) und unter Fällung mit dem II.AK (Fa Paesel 1 : 50 + PEG 6%). Die Standardverdünnung war : 200 - 100 - 25 - 12,5 - 6,25 - 3,13 - 1,56 - 0,78 - 0,39 pg/ml.

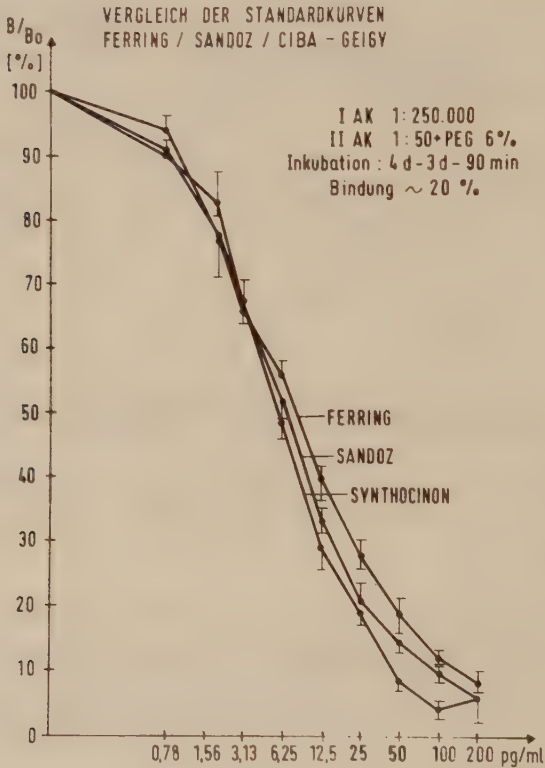


Abb.4 : Vergleich der Standardkurven Ferring / Sandoz / Ciba-Geigy

Wie sich aus obiger Abbildung erkennen läßt, verlaufen alle drei Standardkurven nahezu parallel, jedoch ist im Meßbereich unterhalb von 4 pg/ml die Ferring - Kurve am weitesten nach links verschoben. Da gerade dieser Meßbereich für die basale Sekretion von OT am wichtigsten ist, entschieden wir uns für die Standardkurve, die in diesem Bereich am steilsten ist und damit für die Ferring - Charge. Die Standardkurve wurde aus OT - freiem Nullserum und dem synthetischen OT in geometrischer Verdünnung gewonnen. Zur Nullserum-

Präparation siehe unter 2.1.3.10. Die Standardkurve wurde dem selben Extraktionsverfahren unterworfen wie die zu bestimmenden Serumproben um die Extraktionsverluste zu korrigieren.

2.1.3.7. Extraktion

In der Literatur sind nur zwei RIA's beschrieben, bei denen OT im Serum ohne Extraktion bestimmt wird (46,94). Beide Methoden können jedoch nicht befriedigen. Während Piron-Bossuyt et al. die Sensitivität ihres Assays mit 8 pg/ml angeben (94), erreichen Gorewit et al. nur eine untere Nachweisgrenze von 70 pg/ml (46). Es erschien uns daher nötig ein Extraktionsverfahren durchzuführen um OT in einem bestimmten Plasmavolumen zu konzentrieren und unspezifische Interferenzen von Plasmaproteinen auszuschließen. Wir verwendeten als Extraktionsmittel Äthanol oder Aceton, verzichteten jedoch auf umständliche Adsorptionsverfahren wie sie Chard et al. (19) und Dawood et al (24) mit Fuller's earth beschreiben, die eine schlechte Reproduzierbarkeit und mangelnde Tracerwiederfindung aufweisen.

1 ml Serum wurde mit 100 μ l OT - Tracer gemischt, mit 3ml Äthanol beziehungsweise Aceton extrahiert und an Hand der im Gamma - Counter gezählten cpm die Tracer - wiederfindung berechnet. Für die Extraktion mit Aceton ergab sich eine mittlere Tracerwiederfindung von 70% und die Werte für Äthanol lagen bei 80%. Aus rein praktischen Gesichtspunkten haben wir die Acetonextraktion für die Routine - bestimmung von OT gewählt.

Um die Konzentrationsunabhängigkeit der Extraktion zu untersuchen, wurde mit Nullserum eine Verdünnungsreihe hergestellt (0,2 - 200 pg/ml), 100 μ l Tracer zugegeben und mit 3ml Aceton extrahiert. In dem gesamten untersuchten Bereich ergab sich eine Wiederfindung zwischen 93 und 100%, was die Konzentrationsunabhängigkeit dokumentiert. Zur Ermittlung des Variationskoeffizienten wurden zwei Seren unterschiedlicher Konzentration mit 3ml Aceton extrahiert und Zehnfachwerte bestimmt. Bei einem Mittelwert der Wiederfindung von 87,5% und der Standardabweichung S von 2,2, ergab sich ein Variationskoeffizient von 4,6.

Um auszutesten, ob ein Teil der Extraktionsverluste auf die äußeren Bedingungen der Extraktion zurückzuführen waren, versuchten wir auch hier die idealen Bedingungen zu finden. In drei Versuchsreihen untersuchten wir die Einflüsse von Heizung, Verschluß des Teströhrchens, Schütteln und Vakuum:

Wie die nachfolgende Tabelle zeigt, beweist die hohe Zählrate von 41.000 cpm bei Versuch 1, daß unter diesen Bedingungen die unspezifische Adsorption am Röhrchen am geringsten war. Deshalb wurde der Evaporator auch in der beschriebenen Weise von uns betrieben.

Tabelle 2 : Optimierung der Einflußgrößen des Evaporators

Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	
Heizung 40 °C	Heizung aus	Heizung aus	
Röhrchen offen	Röhrchen zu	Röhrchen zu	
Schütteln normal	Schütteln maximal	Schütteln maximal	n = 10
volles Vakuum	volles Vakuum	volles Vakuum	
16.400 cpm	16.300 cpm	16.500 cpm	100 µl Tracer
4.800 cpm	4.700 cpm	4.800 cpm	100 µl Aceton+Tracer
15.800 cpm	15.000 cpm	14.500 cpm	Aceton verdampft
41.000 cpm	36.000 cpm	28.000 cpm	in 750 µl Puffer resuspendiert und gezählt.

2.1.3.8. Extraktion mittels SEP - PAK - C₁₈ -Kartuschen

Ausgehend von der Beschreibung eines neuen Extraktionsverfahrens für OT (109) verglichen wir diese Methode mit der von uns durchgeführten Aceton- Extraktion. Vor Gebrauch der SEP - PAK - Kartuschen (Fa. Waters Assoc. Inc., USA), ist es notwendig sie mit 10ml Elutionsmittel (Methanol), 10 ml H₂O und schließlich mit 10 ml Puffer zu waschen. Um das Lösungsmittel auszutesten, mit dem die Adsorption von OT an der Kartusche am besten ist, verwendeten wir nacheinander Ammoniumacetatpuffer 0,1 m pH 4, Phosphatpuffer 0,05 m pH 7,5, Tris - Puffer 0,1 m pH 8,6 und H₂O. Pool - Serum wurde 1:4 mit obigen Lösungsmitteln vermischt und OT -Tracer (100 µl) mit einer Aktivität von 28.000 cpm zugegeben. Jeweils 4 ml Serum und Tracer wurden durch die Kartuschen gedrückt, in vier 1 ml - Fraktionen gesammelt und mit 10 ml des jeweilig verwendeten Puffers gespült. Wenn Phosphatpuffer verwendet wurde erwies sich die Zählrate mit 21.750 cpm am höchsten.

Auf Grund der unterschiedlichen Form der SEP - PAK - Kartuschen gegen - über den Polyethylenröhrchen und den dadurch bedingten Zählunterschieden im Gamma-Counter ließ sich die eingesetzte Gesamtaktivität des Tracers GA (28.000 cpm) nicht direkt den wiedergefundenen cpm in den Kartuschen ge-

genüberstellen. Es läßt sich jedoch feststellen, daß die Adsorption von OT in der Kartusche unter Verwendung des 0,05 m Phosphatpuffers am besten ist. Aus diesem Grunde entschieden wir uns für diesen Puffer für unsere Versuche. Als Elutionsmittel testeten wir Methanol, Acetonitril und Tetrahydrofuran. Es wurden jeweils 5 ml eingesetzt und in fünf Fraktionen zu jeweils 1 ml gesammelt.

Tabelle 3: Austesten des Elutionsmittels

		Methanol	Acetonitril	Tetrahydrofuran
cpm pro	1	19.390	5995	15.580
Fraktion	2	2.636	6701	1.134
zu je 1ml	3	109	889	404
	4	37	75	522
	5	66	72	631
Kartusche		689	12.033	7.796
Spülen PO ₄		36	33	84
Wiederfindung		80	48	65
(%)				

Für die Elution mit Methanol ergab sich somit eine Wiederfindung von 80 % (GA 28.000 cpm), während sowohl mit Acetonitril als auch mit Tetrahydrofuran **erhebliche** Restaktivität in der Kartusche verblieb. Zur Überprüfung der Standard - Wiederfindung im Serum wurde OT - Standard im Pool - Serum verdünnt zu 10 und 50 pg / ml mit den Kartuschen extrahiert und mit Methanol eluiert.

Tabelle 4 : Standard - Wiederfindung

		50 pg/ml (n=4)	50 pg/ml (n=4)	10 pg/ml (n=4)
OT - Standard	pg / ml	28,8	35,6	3,9
Wiederfindung	(%)	58	71	39

Aufgrund der unterschiedlichen Standardwiederfindung läßt sich sagen, daß die Extraktion mit SEP - PAK - Kartuschen nur eine schlechte Reproduzierbarkeit aufweist. Deshalb zogen wir die Aceton - Methode vor.

2.1.3.9. Serum - Vorbehandlung

Es ist bekannt ,daß während der Schwangerschaft von der Plazenta eine spezifische Oxytocinase gebildet wird, die zusammen mit unspezifischen Serum-peptidasen zirkulierendes Oxytocin rasch abbaut.Deshalb wurde der Effekt einer Inkubation bei Raumtemperatur vor der radioimmunologischen Bestimmung sowie die Addition von Trasylol, einem Enzyminhibitor , auf die Wiederfindung von immunoreaktivem OT im Schwangeren-und nicht Schwangeren-Serum untersucht.

Nach Zugabe von synthetischem OT zu Pool - Serum kam es auch nach 60 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur bevor extrahiert wurde zu keinen nennenswerten Degradationsverlusten gegenüber einer sofortigen Extraktion. Wurde Schwangeren - Serum mit OT versetzt, so ergab sich mit zunehmender Inkubationszeit eine stetige Zunahme des OT - Gehalts.Nach 30 Minuten war von ursprünglich 25 pg OT nichts mehr nachweisbar.Schwangeren -Plasma , das unter Zusatz von Trasylol und OT inkubiert wurde, zeigte eine schwächere Degradation des zugegebenen OT.Zwar ließ sich die Oxytocinase nicht völlig hemmen, jedoch kam der Abbau nach 30 Minuten zu einem Stillstand mit etwa einem Drittel des ursprünglichen Wertes.

Wir entschlossen uns im folgenden zum Zusatz von Trasylol nicht nur bei den post - partum Studien der Laktation ,sondern zur generellen Proben - vorbehandlung in dieser Weise.Darüberhinaus wurde das Serum sofort nach Blutabnahme bei 4 °C von seinen korpuskulären Bestandteilen getrennt und bis zur radioimmunologischen Bestimmung bei - 80 °C gelagert.

2.1.3.10. Präparation des Nullserums

Voraussetzung für die Verwendung von Pool - Serum als Nullserum ist, daß es kein OT enthält.Um dies zu gewährleisten und um auch kleinste Hormon - mengen auszufiltern wurde es der folgenden Extraktion unterworfen :

- je 100 ml Poolserum werden mit 10 g Norit A - Charcoal vermischt
- 12 Stunden bei 4 °C rühren
- 12 Stunden bei 4°C stehen lassen
- 30 Minuten rühren
- 20 Minuten bei 4 °C in der Kühlzentrifuge abzentrifugieren
- mit dem Seitzfilter abfiltern

2.1.4 . Ansatzschema für den OT - Assay

	Puffer	Standard	Kontrolle	Probe	I.AK 4 Tage	Tracer 3 Tage
B ₀	200 µl	-	-	-	100µl 4 °C.	100µl 4° C.
Standard	-	200 µl	-	-	100µl	100µl
N	300 µl	-	-	-	-	100µl
Kontrolle	-	-	200 µl	-	100µl	100µl
Proben	-	-	-	200µl	100µl	100µl
GA	-	-	-	-	-	100µl

Nach Zugabe des I.AK wird vier Tage bei 4°C. inkubiert, dann wird der Tracer zugegeben und die "heisse Inkubation" drei Tage lang bei 4 °C. fortgesetzt. Zur Trennung von Bound/Free wird in alle Röhrchen außer GA 100 µl II. AK pipettiert und noch einmal zwei Stunden bei 4°C. inkubiert. Nach der Zugabe von 500 µl PEG 6% wird sofort 20 Minuten bei 4°C und 4000 Upm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und der Niederschlag im Gamma - Counter 5 Minuten lang gezählt.

2.1.5. Qualitätskontrolle und Assay - Präzision

Zur Überprüfung der Reliabilität unseres Assays wurde der Intra - und der Inter - Assay-Variationskoeffizient bestimmt. Der Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert betrug für den Intra- Assay - Variationskoeffizienten 6,1 %, wenn der Serum der Konzentration von 50 pg/ml achtmal in einem Ansatz bestimmt wurde. Der Inter - Assay - Variationskoeffizient betrug 8,8, %.

2.2. Prolaktin - RIA

Die PRL - Bestimmung erfolgte mit einem laboreigenen RIA unter Verwendung von Kaninchen - Antiserum , J¹²⁵- Prolaktin und der Doppelantikörper - Trennmethode (133,134).

2.2.1. Reagentien

0,05 m Phosphat - Puffer + 1% Albumin

0,01 m Phosphat - Puffer + 0,01 m EDTA (0,37 g EDTA ad 100 ml Puffer)

+ 0,15 m NaCl (0,88 g NaCl ad 100 ml Puffer) + 1 % Albumin

I. AK (1 : 10.000)

II.AK (Fa. Paesel)

PRL - Standard : 25 - 50 - 100 - 200 - 400 - 800 - 1600 - 3200 - 6400

für die Eichkurve standardisiert wird. Die Prolaktin - Werte werden in $\mu\text{E} / \text{ml}$ angegeben.

2.2.2. Ansatzschema

	Puffer I	Puffer II	Standard	Kontrolle	Proben	I.AK	Tracer
B_0	100 μl	200 μl	-	-	-	100 μl	100 μl
Standard	-	200 μl	100 μl	-	-	100 μl	100 μl
N	400 μl	-	-	-	-	-	100 μl
Kontrolle	-	200 μl	-	100 μl	-	100 μl	100 μl
Probe	-	200 μl	-	-	100 μl	100 μl	100 μl
GA	-	-	-	-	-	-	100 μl

Nach der Tracerzugabe wird das Reaktionsgemisch einen Tag lang bei 4°C . inkubiert, nach dem Pipettieren von je 100 μl II.AK (1 : 50) nochmals zwei Stunden inkubiert, 20 Minuten bei 4000 Upm zentrifugiert, abgesaugt und im Gamma- Counter gezählt.

2.3. LH - Bestimmung

Die LH - Bestimmung erfolgte mit einem RIA unter Verwendung von Reagentien von NIH (Bethesda, USA). Folgende Reagentien gelangten dabei zur Anwendung:

2.3.1. Reagentien

0,05 m Phosphatpuffer + 1 % Albumin

I.AK 1:120.000 (NIH)

LH - Tracer (NIH)

LH -Standard in mE/ml (Fa. Kabi)

Die Ausgangskonzentration von 500 mE/ml wird mit Puffer weiterverdünnt auf folgende Konzentrationen:

0,2 - 0,39 - 0,78 - 1,56 - 3,13 - 6,25 - 12,5 - 25 - 50 - 100 mE/ml

II.AK 1 : 45 (Fa. Paesel)

2.3.2. Ansatzschema

Die kalte Vorinkubation erfolgte während zwei Tagen. Nach der Tracerinkubation von einem Tag werden 100 μl II.AK in jedes Röhrchen außer in GA pipettiert und diese fünf Sekunden auf dem Vortex geschüttelt sowie nochmals zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Das Reaktionsgemisch

wird schließlich 20 Minuten bei 4000 Upm zentrifugiert, der Überstand abgeseugt und die Aktivität eine Minute lang im Gamma - Counter gemessen.

	Puffer	Standard	Kontrolle	Proben	I.AK	zwei d. Tracer	ein d.
B ₀	300µl	-	-	-	100µl	Inkub.	100µl
Standard	200µl	100µl	-	-	100µl	100µl	
N	400µl	-	-	-	-	100µl	
Kontrolle	200µl	-	100µl	-	100µl	100µl	
Proben	200µl	-	-	100µl	100µl	100µl	
GA	-	-	-	-	-	100µl	

2.4. FSH - RIA

Auch für die FSH Bestimmung gelangten Reagentien vom NIH (Bethesda) zur Verwendung.

2.4.1. Reagentien

0,05 m Phosphat - Puffer + 1 % Albumin

I.AK 1 : 135.000 (NIH)

FSH - Tracer (NIH)

II.AK 1:50 (Fa. Paesel)

FSH - Standardkurve (IE, NIH)

(0,39 - 0,78 - 1,56 - 3,13 - 6,25 - 12,5 - 25 mE / ml)

2.4.2. Ansatzschema

	Puffer	Standard	Kontrolle	Probe	I.AK	zwei d. Tracer
B ₀	100µl	-	-	-	300µl	Inkub. 100µl
Standard	-	100µl	-	-	300µl	100µl
N	400µl	-	-	-	-	100µl
Kontrolle	-	-	100µl	-	300µl	100µl
Proben	-	-	-	100µl	300µl	100µl
GA	-	-	-	-	-	100µl

Nach der kalten Vorinkubation von zwei Tagen bei 4°C ,erfolgt die Tracerinkubation einen Tag lang bei gleicher Temperatur.Nach Zugabe von je 100 µl II.AK in jedes Röhrchen wird nochmals zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, zwanzig Minuten bei 4000 Upm zentrifugiert, der

Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Aktivität der Niederschläge im Gamma - Counter bestimmt.

2.5. Östradiol - RIA

17 - Beta - Östradiol wurde nach Vorschrift mit einem Kit der schweizer Firma Eiria (Eidgenössisches Institut für Reaktorforschung, CH -5303 Würenlingen) bestimmt.

2.6. PROG - RIA

Ebenfalls mit Kit nach Vorschrift erfolgte die Bestimmung von Progesteron, nämlich mit dem " RIA - gnost, Progesteron ". (Behring - Werke AG)

2.7. TSH - RIA

Die TSH - Bestimmung wurde mit dem von Erhardt et al. beschriebenen TSH -RIA durchgeführt (31).

3. Klinische Untersuchungen

3.1. Oxytocin

3.1.1. Verhalten von Oxytocin während des ovulatorischen Zyklus

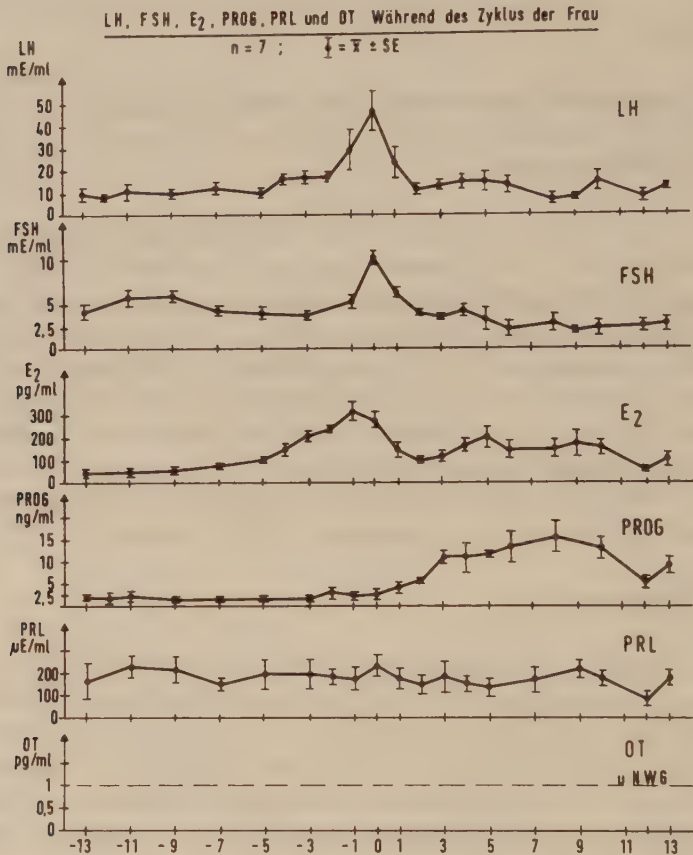
3.1.1.1. Versuchsprogramm

Bei zehn fertilen Frauen wurde täglich die Basaltemperatur im Verlauf eines ovulatorischen Zyklus gemessen. Keine der Frauen nahm bis drei Wochen vor der Untersuchung Medikamente oder orale Antikontrazeptiva ein. Während eines menstruellen Zyklus wurden vom 1. - 8. jeden zweiten Tag Blutproben abgenommen, vom 9. - 15. Tag erfolgte die Blutabnahme täglich und vom 16. - 28. Zyklustag jeweils jeden dritten Tag. Jeder Zyklus umfaßte auf diese Weise 14 Blutabnahmen. Die Trennung des Blutes von seinen korpuskulären Bestandteilen erfolgte sofort bei 4°C . und es wurde Tra-sylol zur Hemmung des enzymatischen Abbaus zugegeben. Bis zur radioimmunologischen Bestimmung wurden die Proben bei -80°C . gelagert.

3.1.1.2. Ergebnisse

Von den ursprünglich vorgesehenen zehn Probandinnen konnten schließlich nur sieben ausgewertet werden, da drei während des Beobachtungszeitraumes anovulatorische Zyklen beziehungsweise eine Lutealinsuffizienz aufwiesen. Von den sieben verbliebenen ließen sich Normalbereiche für LH, FSH, PRL, PROG und E_2 aufstellen. Die einzelnen Zyklen wurden miteinander synchronisiert, indem der Tag des maximalen LH - Peaks als Tag 0 bezeichnet, und die restlichen Tage darauf bezogen wurden. Diese Art der Synchronisation birgt, was die interindividuell verschiedene Zyklusdauer anlangt, gewisse Fehler in sich; diese nahmen wir jedoch in Kauf, da es im wesentlichen darum ging einen eventuell vorhandenen OT - midcycle - peak nachzuweisen, und, da sonst für jede Versuchsperson mehrmalige Zyklusmessungen nötig gewesen wären. Im einzelnen wurden an den verschiedenen Zyklustagen der Mittelwert der gemessenen Hormone, die Standardabweichung sowie der standard error berechnet. Zweck meiner Messungen war nicht bereits bekannte Zyklusprofile zu reproduzieren, sondern die OT - Sekretion während dieses Zeitraumes zu untersuchen.

Abb.5: LH, FSH, PRL, E₂, PROG und OT während dem weiblichen Zyklus (n=7)



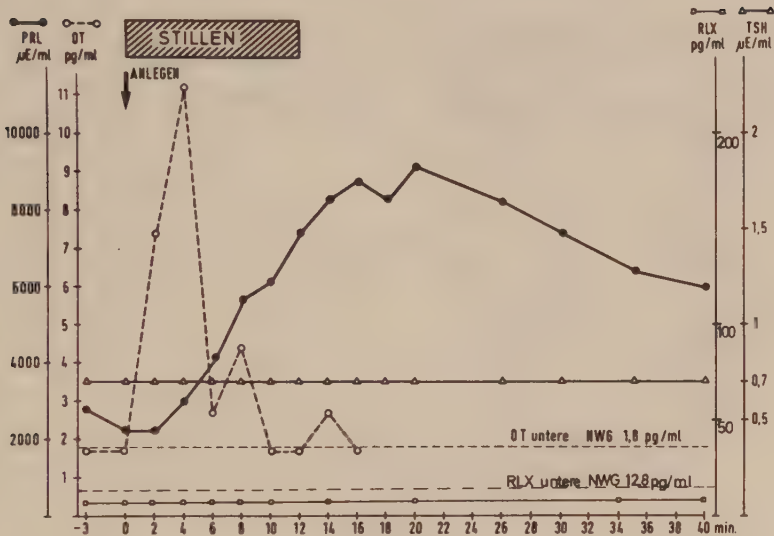
Die OT - Werte blieben während des gesamten Zyklus unterhalb der Nachweis - grenze von 1,5 pg/ml und somit im Bereich der basalen Sekretion.

3.1.2. Stimulation der OT - Sekretion

3.1.2.1. Laktation

In der vorliegenden Untersuchung bestimmten wir in kurzen Zeitabständen von jeweils zwei Minuten OT, PRL und TSH bei zwei Müttern während des Stillens in der frühen postpartalen Phase. Beim ersten Versuch wurde das Kind selbst gestillt und beim zweiten die Milch mit einer Pumpe abgepumpt.

Abb. 6 : OT, PRL und TSH - Verlauf während des Stillens.

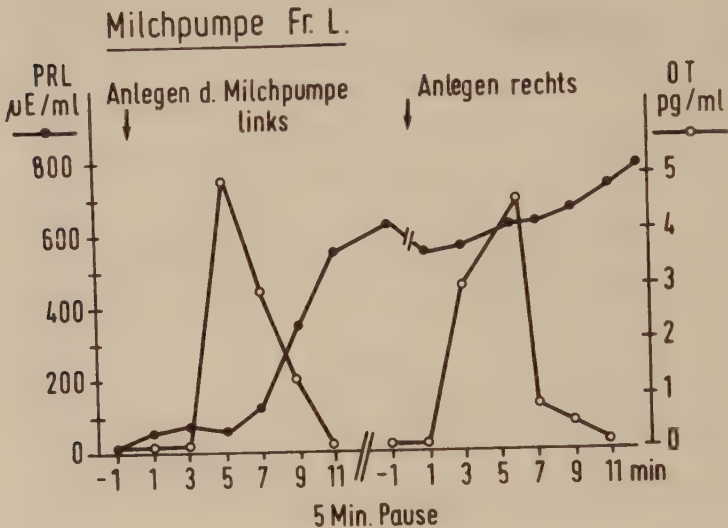


Beim Betrachten obiger Ergebnisse fällt auf, daß OT vier Minuten nach Beginn des Saugreizes einen Peak von 11,5 pg/ml aufweist und bei Fortbestand des Stimulus noch zwei weitere, kleinere OT - Spitzen auftreten. Vor Stillbeginn war durch emotionale Stimuli wie durch Weinen oder Spielen mit dem Kind keine OT - Freisetzung nachweisbar.

Anders verhält sich PRL : Es kommt zu einem kontinuierlichen Anstieg ausgehend von 2300 µE/ml, dessen Beginn zeitlich mit dem OT - Peak zusammenfällt. Maximale Werte von 9400 µE/ml werden dagegen erst 8 Minuten nach Beendigung des Stillvorganges erreicht.

Eine TSH - Stimulation ist nicht erkennbar.

Abb.7 : OT und PRL während des Milchabpumpens mit einer Pumpe



OT weist 5 Minuten nach dem Anlegen beidseits einen Peak von 5 pg/ml auf, ohne daß es danach noch zu weiteren Sekretionsspitzen kommt.

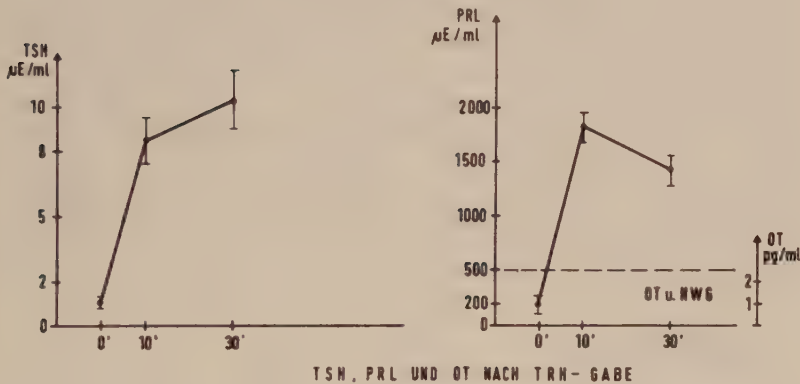
6 Minuten nach dem OT - Maximum kommt es zum PRL - Peak und nach einem Abfallen der Werte bedingt durch die 5-minütige Stillpause vor dem Anlegen der Milchpumpe an der anderen Brust, steigen diese erneut bis zu einem zweiten Maximum um 8000 µE/ml, das 5 Minuten nach Stillende erreicht wird. Auch bei diesem Versuch war keine TSH - Stimulation nachweisbar.

3.1.2.2. TRH , GRF, IHT , Drehstuhlversuche

Bei den selben Probandinnen, die bereits zur Zyklusuntersuchung herangezogen worden waren, wurde am 11. Zyklustag ein TRH - Test (200 µg) mit drei weiteren Blutabnahmen jeweils 0, 10 und 30 Minuten nach Injektion des Releasing - Hormons TRH durchgeführt. Es wurden TSH , PRL und OT bestimmt.

Abb.8 : TSH, PRL und OT nach TRH - Applikation (200 µg)

$\bar{x} \pm SE$ TRH - TESTS (n=7)



TRH ist bekannt als hypothalamischer Releasing - Faktor für TSH und PRL. Die in obiger Abbildung dargestellten Ergebnisse korrelieren gut mit bereits bekannten Daten (23). Für OT war keine Stimulation nachweisbar.

1982 wurde GRF ,dessen Existenz schon lange postuliert worden war, aus einem Pankreastumor isoliert und synthetisiert (48,124). Fünf Probanden erhielten 100 µg GRF injiziert, beziehungsweise zwei zunächst eine Bolusinjektion von 50 µg und danach eine Dauerinfusion. GRF führte wie erwartet zu einem signifikanten Anstieg von Wachstumshormon ohne die anderen Hormone des Hypophysenvorderlappens zu beeinflussen (135). Auch die OT - Sekretion blieb unbeeinflusst.

Es ist bekannt, daß Stress zu einer Stimulation einer Vielzahl von Hormonen wie HGH, ACTH, Cortisol und PRL führt. Um eine eventuell durch Stress auslösbare OT Freisetzung zu untersuchen, führten wir daher den Standard- Stress-Test, den Insulin Hypoglykämie - Test , bei zwei Versuchspersonen durch und bestimmten in dessen Verlauf ACTH, Cortisol und OT.

Bei beiden Probanden kam es zum erwarteten Anstieg von ACTH und Cortisol, OT blieb jedoch im Bereich basaler Sekretion.

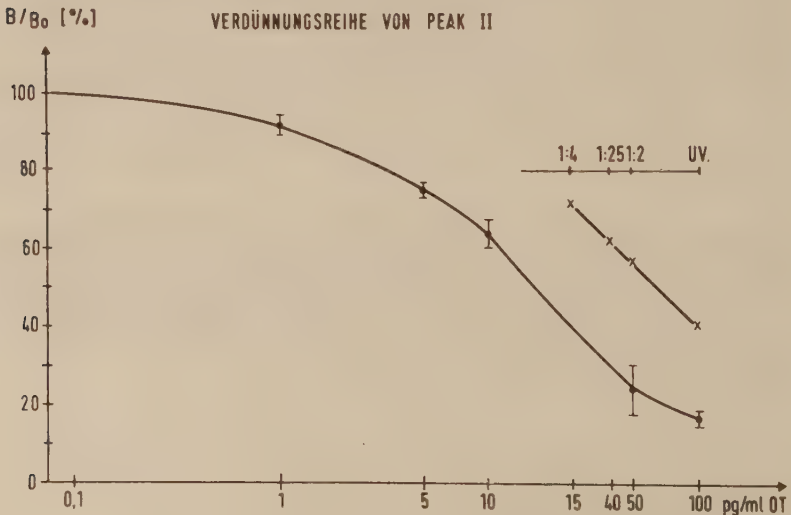
Eine andere Möglichkeit Stress zu induzieren ergibt sich aus der Stimulation des Vestibularorgans. Durch diesen sogenannten Coriolis-Effekt kommt es zur Ausschüttung von ADH aus der Neurohypophyse und damit zur verstärkten Wasserrückresorption am distalen Nierentubulus. Andere bei Stress erhöhten Hormone wie HGH, PRL und Cortisol werden bei der Reizung des Gleichgewichtsorgans weniger deutlich stimuliert (30). Drei Probanden wurden mit Hilfe des Drehstuhlsimulators am Institut für Flugmedizin in Fürstentfeldbruck mit verbundenen Augen im Uhrzeigersinn gedreht, wobei die Winkelgeschwindigkeit schrittweise bis auf $215^{\circ}/s$ gesteigert wurde. Von den untersuchten Proben enthielt nur eine OT. Bei dieser war die Konzentration mit $27,8 \text{ pg/ml}$ jedoch relativ hoch.

3.1.2.3. Seminalplasma

Wir untersuchten 10 ml eines Seminalplasma-Pools (Prof. Schill, Andrologische Abteilung der Dermatologischen Klinik München).

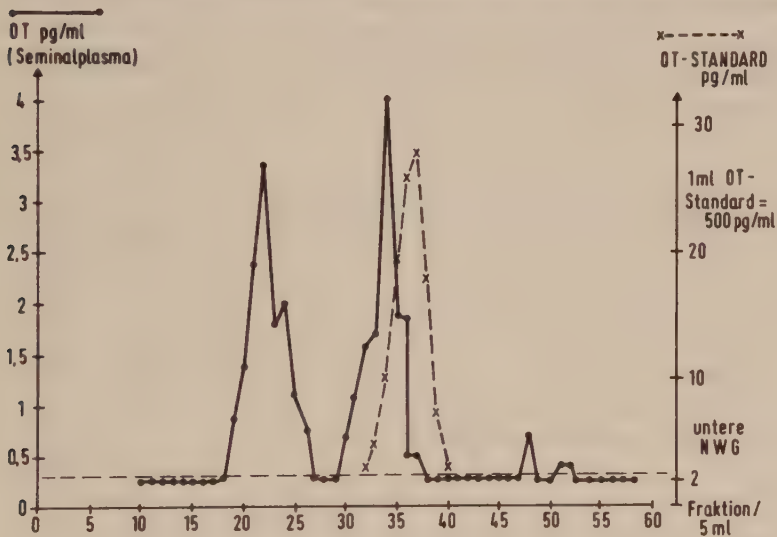
Eine geometrische Verdünnung von Peak II des Elutionsprofils des Seminalplasmas wies Parallelität mit der Standardkurve auf, ein Charakteristikum, das als Hinweis auf das Vorhandensein von OT gilt. Der OT-Gehalt konnte durch die Verdünnungsreihe auf 28 pg/ml beziffert werden. Dies ist das erste Mal, daß OT im Seminalplasma gemessen wurde.

Abb. 9a: Verdünnungsreihe von Peak II des Seminalplasmas



Um das Elutionsprofil von OT - Standard und dem Seminalplasma miteinander vergleichen zu können führten wir eine Säulenchromatographie durch. Das Seminalplasma wurde auf eine Sephadex G 50 feine Säule (2,5 · 58 cm) aufgetragen, die zuvor mit 3ml 10 % Albumin - Lösung abgesättigt worden war . Zur Säulenpräparation siehe unter 2.1.2.2. Die Elution erfolgte mit dem OT - Assay - Puffer.

Abb.9b : Elutionsprofil von OT - Standard und 10 ml Seminalplasma



Aus obiger Abbildung wird deutlich, daß synthetisches OT (Ferring) zwischen den Fraktionen 32 und 38 eluiert. Das entspricht Peak II des Seminalplasmas. Bei Peak I handelt es sich um höhermolekulare Aggregate, die aufgrund ihres Molekulargewichts und Elutionseigenschaften von OT verschieden sind. Aus der Parallelität des Peak II mit der Standardkurve und gleichem Elutionsverhaltens von synthetischem OT ergibt sich der Nachweis von OT im Seminalplasma.

3.1.2.4. Hyperprolaktinämie

Um zu untersuchen , ob OT beim hyperprolaktinämischen Hypogonadismus eine Rolle spielt, wurde OT bei den unter 3.2. näher beschriebenen Patientinnen mehrfach bestimmt. Es ergaben sich keine Anhaltspunkte für eine Mehrsekretion

von OT bei Hyperprolaktinämie.

Auch die unter 3.2.1. geschilderte Gabe von dopaminagonistischen und - antagonistischen Substanzen blieb ohne Einfluß. Die OT - Spiegel blieben während allen Untersuchungen im Bereich basaler Sekretion.

3.2. Interaktion zwischen PRL und Gonadotropinen bei der Hyperprolaktinämie

Die Bestimmung der PRL - Spiegel spielt in der diagnostischen Abklärung der Ursachen einer Amenorrhoe eine zentrale Rolle. 19 % aller sekundären Amenorrhoeen sind durch eine Hyperprolaktinämie bedingt (110,136). Das Prolaktinom ist der häufigste Hypophysentumor. Die Klinik der Hyperprolaktinämie der Frau beinhaltet als Leitsymptom die Amenorrhoe oder anovulatorische Zyklusstörung, daneben kommt es zu einer Beeinträchtigung der sexuellen Aktivität sowie zu einer Galaktorrhoe, die in etwa 70 % der Fälle auftritt (ibd.). Ursache der auftretenden Zyklus- beziehungsweise Libido - und Potenzstörungen ist ein hypothalamischer Hypogonadismus. Zur Erklärung des Krankheitsbildes dient folgende Modellvorstellung: Erhöhte PRL - Spiegel führen im Hypothalamus zu einem gesteigerten Dopamin-Turnover (86). Dieser vermehrte Anfall von Dopamin hemmt die LH - RH - Sekretion und führt zu einer sekundären Atrophie gonadotropher HVL - Zellen, die sich nach lange bestehender Hyperprolaktinämie auch exogenem LH - RH gegenüber refraktär verhalten (139).

Um die Rolle eines zentral gesteigerten dopaminergen Tonus zu untersuchen, führten wir eine Studie mit dem Dopaminantagonisten MC und dem Dopaminagonisten BC an zwei hyperprolaktinämischen Patientinnen durch. Danach versuchten wir bei zwei Patientinnen mit Makroprolaktinomen, die sich der Therapie mit Dopaminagonisten gegenüber refraktär verhielten, durch pulsatile Gabe von LH - RH ovulatorische Zyklen auszulösen.

3.2.1. Einfluß von dopaminergen Substanzen auf PRL, LH und FSH

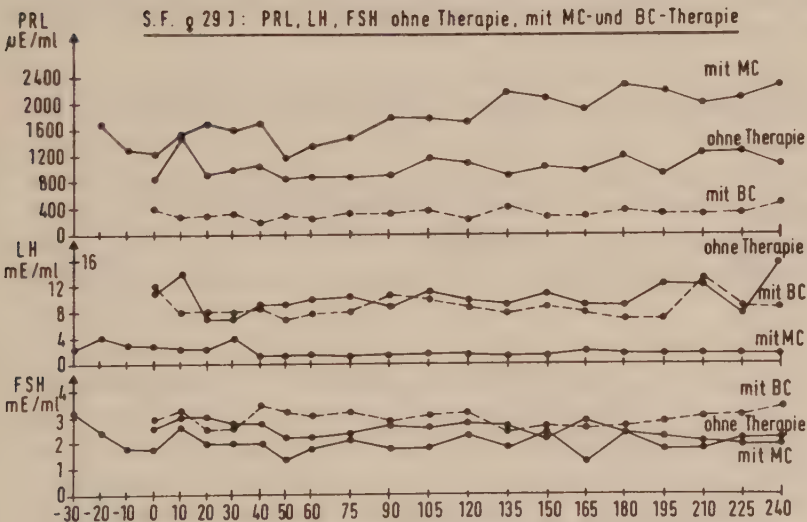
Patientinnen

S.F., 29 Jahre, dreijährige sekundäre Amenorrhoe, 1979 normale Entbindung und Stillzeit. Danach unter Antiovulantien schwache, regelmäßige Periodenblutung. Nach Absetzen der Pille persistierende, sekundäre Amenorrhoe. 1981 Diagnose eines Mikroprolaktinoms ohne supraselläre Extension mit Galaktorrhoe. Unter BC und Lisurid zunächst Normalisierung der PRL - Werte von 1700 $\mu\text{E/ml}$ auf 240 $\mu\text{E/ml}$ mit Auftreten von regelmäßigen Blutungen. Die Therapie mußte jedoch wegen Unverträglichkeit abgebrochen werden. Es kam zu einem erneuten Ansteigen der PRL - Spiegel auf 1000 $\mu\text{E/ml}$ und da die

die Patientin regelmäßige Perioden wünscht, wurde ein Kontrazeptivum mit niedrigem Östrogenanteil verordnet.

U.A., 27 Jahre, seit 1979 Oligomenorrhoe bei zuvor normaler Menses, seit 1982 Amenorrhoe, PRL um 15.000 $\mu\text{E}/\text{ml}$. Eine Galaktorrhoe lag nicht vor. Diagnose eines intrasellären Prolaktinoms, unter Pravidel -Therapie Normalisierung der PRL - Werte. Nach Auslaßversuch erneutes Ansteigen auf 3200 $\mu\text{E}/\text{ml}$. Da Kinderwunsch besteht, wurde die Therapie fortgesetzt um eine Konzeption zu erzeugen.

Abb .10 : Patientin S.F., LH , FSH und PRL ohne Therapie, mit MC und BC



Basalprogramm

Bei beiden Patientinnen wurde vier Stunden lang kontinuierlich Blut ab - genommen und die Kanüle mit Kochsalzlösung offen gehalten. Die Blutab - nahme erfolgte in der ersten Stunde alle zehn Minuten und danach alle

fünfzehn Minuten durch Proben von jeweils 10 ml.

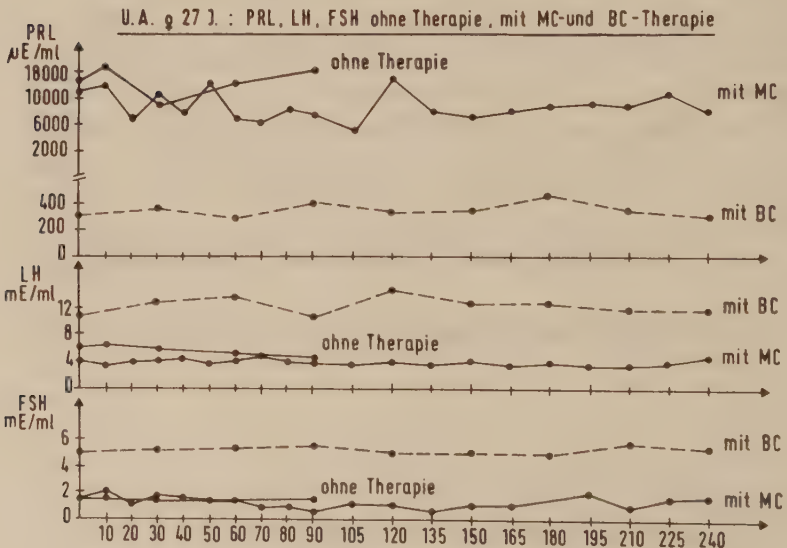
MC - Infusion

Das Untersuchungsprogramm wurde auf 4 1/2 Stunden ausgedehnt. Beide Patientinnen erhielten nach 30 Minuten eine Injektion von 10 mg MC i.v. Anschließend wurde eine Perfusor- Infusion angeschlossen. Es wurden vier Ampullen MC (8 ml) und 16 ml Kochsalz aufgezogen und der Perfusor auf Stufe 4 eingestellt, was einer Dosis von 10 mg MC/ h oder 6ml/h entsprach. Nach drei Stunden wurde die Perfusor- Infusion gestoppt und noch eine Stunde darüberhinaus jeweils alle 15 Minuten Blut abgenommen.

BC - Therapie

Die gleiche Untersuchung wie sie im Basalprogramm beschrieben ist, wurde nach Beginn der Behandlung mit BC durchgeführt.

Abb.11: Patientin U.A., LH, FSH und PRL ohne Therapie, mit MC und mit BC



Ergebnisse :

Während bei Patientin S.F. eine mäßig ausgeprägte Hyperprolaktinämie von basal 1000 bis 1400 $\mu\text{E/ml}$ vorlag, wies die Patientin U.A. mit 15000 $\mu\text{E/ml}$ deutlich erhöhte Werte auf. Entsprechend waren auch die Gonadotropine bei letzterer stärker erniedrigt : LH 4-5 mE/ml , FSH 1-2 mE/ml gegenüber den nur gering supprimierten Werten von Patientin S.F. : LH 8-14 mE/ml , FSH 2-3 mE/ml . Nach MC - Applikation stiegen die PRL - Werte bei Patientin S.F. bis auf 2400 $\mu\text{E/ml}$. Demgegenüber kam es zu einem deutlichen Abfall der LH und FSH - Spiegel mit 2-4 beziehungsweise 1-2 mE/ml . Bei der Patientin U.A. kam es unter MC zu keiner weiteren Stimulation von PRL, das im Verlauf des Tests spikes zwischen 6000 und 14.000 $\mu\text{E/ml}$ aufwies. LH und FSH - Werte waren mit 3-5 und 1-2 mE/ml praktisch unverändert. Unter BC - Therapie normalisierten sich die PRL - Spiegel beider Patientinnen wieder, auch stiegen die Gonadotropine wieder an.

3.2.2. Pulsatile Gn - RH - Therapie bei Prolaktinomen

Die pulsatile Sekretion von LH - RH in Abständen von 60 - 120 Minuten wurde zunächst am Rhesus - Affen ausführlich untersucht (62). Dieser Sekretions - modus steht auch beim Menschen auf fester physiologischer Grundlage und heute weiß man, daß der Hypophysenvorderlappen zu seiner normalen gonadotropen Funktion dieser pulsatilen Stimulation im zirkhoralen Muster bedarf (63), damit es zu einer normalen Follikelreifung kommen kann. Das Versagen langwirksamer LH - RH - Analoga bei der Induktion ovulatorischer Zyklen findet darin seine Erklärung (50).

Ausgehend von der pulsatilen Sekretion ergab sich das Konzept, bei Frauen, die an hypothalamischer Amenorrhoe mit mangelnder oder fehlender LH - RH - Freisetzung leiden, durch exogen zugeführtes Releasing - Hormon ovulatorische Zyklen auszulösen (71,72). Mit der für die pulsatile Applikation entwickelte Pumpe (Zyklomat, Fa. Ferring) wurde im November 1979 die erste Schwangerschaft induziert (73).

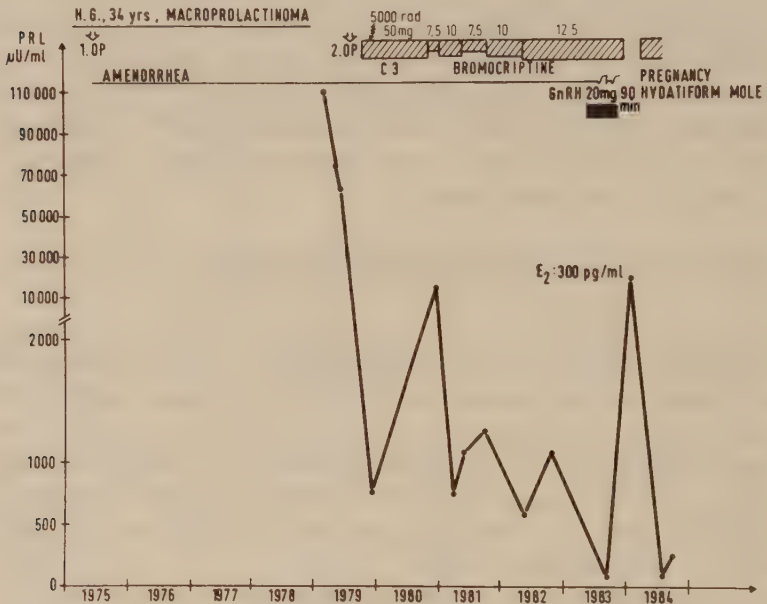
Im folgenden möchte ich die Induktion der Ovulation mit nachfolgender Schwangerschaft durch diese Pumpe bei zwei Patientinnen beschreiben, die an einem therapierefraktären Makroprolaktinom litten und, bei denen Kinder - wunsch bestand.

Patientinnen:

H.G: 34 Jahre, Makroprolaktinom bei Zustand nach zweimaliger transspenoidaler OP (1975 und 1979) mit post-op Radiation und nachfolgender kompletter HVL - Insuffizienz. Unter Pravidel Normalisierung der persistierenden Hyper -

prolaktinämie. Basale Gonadotropine im LH - RH - Test gering stimulierbar: LH von 2,7 auf 4,9 mE/ml und FSH von 1,5 auf 2,1 mE/ml. PRL ging unter Therapie auf 295 μ E/ml zurück.

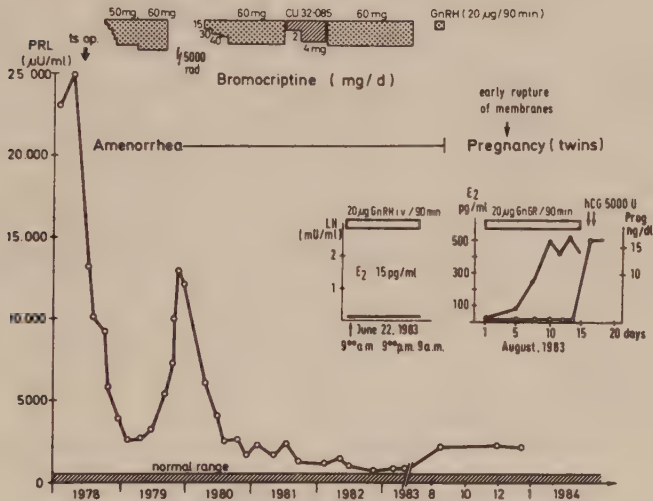
Abb.12: PRL - Spiegel und Ovarialfunktion bei 34 - jähriger Frau mit Makroprolaktinom nach zweimaliger transsphenoidaler OP, Radiatio, Dopaminagonisten-Therapie und Gn - RH - Gabe



Zwar kam es unter pulsatiler Zyklomat - Therapie zur Ovulation mit nachfolgender Schwangerschaft, es wurde jedoch eine Blasenmole diagnostiziert und in der 12. SSW curettiert.

O.K.: 32 Jahre, Makroprolaktinom bei Zustand nach transsphenoidaler OP, Radiotherapie und langjähriger hochdosierter BC - Medikation. PRL - Werte auf 930 μ E/ml. Gestagentest negativ. E₂ 17 pg/ml. Gonadotropine deutlich erniedrigt: LH 0,7, FSH 0,3 mE/ml; im LH - RH - Test nur gering auf 1,2 beziehungsweise 0,5 mE/ml stimulierbar.

Abb.13 :PRL - Spiegel und Ovarialfunktion bei 31- jähriger Frau mit Makro-
prolaktinom, nach transspenoidaler OP, Radiatio, Therapie mit Do-
paminagonisten und pulsatiler Gn - RH - Gabe



Patientin D.K. zeigte anfangs bei 24 - stündiger LH - RH - Gabe ein total refraktäres Verhalten der gonadotropen HVL - Zellen. Erst die Langzeitapplikation führte nach fünf Tagen zu einem Anstieg der E_2 -Spiegel mit nachfolgender Ovulation. 16 Tage nach Therapiebeginn waren die PROG - Werte auf 17 ng /ml angestiegen und die Patientin erhielt zur Unterstützung der Umwandlung des corpus luteum in ein corpus luteum graviditatis 5000 IU HCG injiziert. Zwar führte diese Behandlung zu einer Zwillingschwangerschaft, leider kam es jedoch in der 16. SSW zum vorzeitigen Blasensprung und nach einigen Wochen des stationären Aufenthalts auch zum Abort. Nach nochmaliger pulsatiler Gn - RH - Therapie kam es 1984 erneut zu einer erfolgreichen Schwangerschaft.

4. Diskussion

In den letzten Jahren häuften sich Daten , die darauf hindeuten, daß OT an der Regulation des weiblichen Zyklus beteiligt ist. So führt die Immunisierung von Schafen gegen OT zu einer Verlängerung der Lutealphase (34,108), und die Gabe von OT an Kühe hat einen luteolytischen Effekt, das heißt, es kommt zur Involution des corpus luteum (5). OT stimuliert in vivo die Freisetzung von PGF_{2a} aus dem Uterus (82,113), das bei manchen Spezies eine Rolle in der Luteolysis spielt (78). Schließlich wiesen Wathes und Swann in corpora lutea von Schafen hohe OT - Konzentrationen nach, die auf eine lokale Synthese im Ovar schließen lassen . (129,130). Auch beim Menschen wurden einige Studien durchgeführt. Amico et al. fanden bei Frauen mit normaler Regel eine signifikante Erhöhung OT und seinem assoziierten Neurophysin zur Zeit der Ovulation (2). Zu ähnlichen Ergebnissen kam auch Mitchell et al. , der zusätzlich über einen schwächeren Anstieg von OT zur Zeit der Luteolysis berichtet, der sich jedoch nicht immer nachweisen ließ (83,84).

Im Verlauf unserer Messungen konnten wir weder zum Zeitpunkt der Ovulation noch bei der Involution des corpus luteum eine Erhöhung der OT - Sekretion nachweisen. Die Meßwerte lagen im Bereich der basalen Sekretion von 1 - 2 pg /ml und unterstützen somit nicht die These, daß es bei der Ovulation zu einem OT - Anstieg kommt. Amico et al. fanden einen mittleren OT - Peak von 4 pg/ml und geben die Werte für die follikuläre Phase mit 2,3 pg/ml beziehungsweise in der Lutealphase mit 1,4 pg/ml an. Parallel dazu verlief das dem OT assoziierte Neurophysin (2). Mitchell et al. dagegen berichten über einen OT - Anstieg bei der Ovulation von 25 pg/ml und einen zweiten Peak mit 20 pg/ml (83,84). Seine Meßwerte lagen in jeder Phase des Zyklus im Bereich von über 10 pg/ml - eine Größenordnung, die als zu hoch erscheint, liegt sie doch um ein Vielfaches über der basalen Sekretion, die von Autoren mit 1 - 2 pg/ml angegeben wird (2,68). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt läßt sich keine Aussage darüber machen , ob der micycle peak von OT , wie er beschrieben wurde in einem kausalen Zusammenhang mit der Ovulation steht, oder nur ein Phänomen darstellt, da seine Begründung in dem präovulatorischen Anstieg von E_2 findet, das seinerseits OT stimuliert. Auch wenn unsere Messungen keinen Anhaltspunkt für eine Beteiligung von OT an der Regulation des weiblichen Zyklus liefern, kann eine solche nicht

ohne weiteres ausgeschlossen werden. Insbesondere wäre in diesem Zusammenhang zu überprüfen, ob und in welcher Größenordnung im Ovar eine OT - Synthese stattfindet, die in ihrer Wirkung lokal beschränkt ist, ohne daß die Plasmaspiegel notwendigerweise merklich steigen (35,129,130).

An dieser Stelle läßt sich über die Rolle des OT während der Ovulation nur spekulieren. Unter der Voraussetzung einer lokalen Synthese im Ovar erscheint eine regulatorische Wirkung gegenüber der PROG - Synthese möglich. Tan et al. fanden, daß OT in Konzentrationen von 800 - 1600 pg/ml in vitro die PROG - Synthese inhibierte (121). Die hohe Konzentration, bei der der luteolytische Effekt zum Tragen kommt, macht einen Mechanismus erforderlich, der die lokale Synthese von OT im Ovar steuert; denkbar wäre ein kritischer E_2 -Spiegel als Stimulus für die OT - Produktion.

Andererseits schreiben manche Autoren OT eine direkte Beeinflussung der Gonadotropinsekretion zu, doch sind die Daten hierüber kontrovers. Griffiths und Hooper fanden, daß OT den Abbau von LH - RH inhibierte (47), so daß mehr LH - RH für die Stimulation von LH beim midcycle peak zur Verfügung stand. Nach OT - Infusion fand Dawood keinen signifikanten Anstieg von LH und FSH (25), während Franchimont et al. eine Erhöhung der Gonadotropinspiegel feststellten (40).

Schließlich ist die OT - eigene Erhöhung der Kontraktilität glatter Muskelzellen als periovulatorische Wirkung in Betracht zu ziehen. Nach Studien von Stern - Borda erhöht OT kurz vor dem Eisprung die Kontraktilität im Ovar (120). Auch ist bekannt, daß die tuba ovarii OT - Rezeptoren besitzen (118). OT könnte also durch Zunahme der Kontraktilität den Transport und die Nidation des Eis sowie die Aszension der Spermien beeinflussen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen der Laktation zeigen, daß der Saugreiz einen potenten Stimulus darstellt sowohl für die Sekretion von OT als auch von PRL. Dies bestätigt frühere Untersuchungen (26,80,132) und steht im Gegensatz zu einer Studie von Lucas et al., der fand, daß der " milk-let - down " nicht notwendigerweise von der Freisetzung von OT begleitet wird (74). Untersuchungen mittels Bioassay (21,39,51) und RIA (26,80,132) weisen mit 13 - 860 pg/ml eine sehr große Streuung der OT - Werte während des Stillens auf. Diese große Divergenz erklärt sich zum Teil durch die relative Insensitivität des Bioassays. Der schnelle OT - Anstieg bei unseren Stillversuchen mit einem Maximum nach 4 beziehungsweise 5 Minuten, deckt sich im wesentlichen mit den Befunden von Weitzmann et al. (132) und Dawood et al. (26), bei denen es 6 beziehungsweise 10 Minuten nach Stillbeginn zum OT - Peak kam. Die Absolutwerte unserer Ergebnisse korre -

lieren besonders gut mit der Studie von Weitzmann, bei der auch die basalen Spiegel vor Beginn des Saugaktes unter 2 pg/ml lagen. Dawood fand dagegen schon davor mit 10 pg/ml stark erhöhte OT - Werte und seine Maxima lagen mit 53 pg/ml deutlich über unseren. Es ist bekannt, daß der Reflex, der zur Milchejektion führt leicht konditionierbar ist (125) und, daß es bereits vor dem Stillen durch die Unruhe oder das Weinen des Kindes zu Milchaustritt bei der Mutter kommen kann (80) - eine Tatsache, die die bereits vor Beginn des Stillens erhöhten Werte in der Dawood 'schen Studie erklären könnte. Bei unseren Versuchen jedoch wurde eine durch emotionale Stimuli ausgelöste OT - Freisetzung ohne begleitenden Saugakt nicht nachgewiesen.

Bezüglich der OT - Sekretion können sehr große individuelle Unterschiede bestehen, die es praktische unmöglich machen bestimmte Normalbereiche anzugeben. So weiß man, daß die Sensitivität der Mamma vom ersten Auftreten der Laktation an in der frühen postpartalen Phase ständig zunimmt. Die maximale Sensitivität wird zwischen dem fünften und siebten Tag postpartum erreicht (105). Der von Dawood et al. beschriebene bimodale Verlauf der OT - Sekretion (26), der zu einem schwächeren Peak führen soll, wenn die Milchpumpe an der anderen Brust angelegt wird, konnte von uns nicht bestätigt werden. Zwischen den beiden Maxima zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede. Auffällig allerdings ist, daß bei Versuchen mit der Milchpumpe im Gegensatz zum natürlichen Stillvorgang OT wieder auf basale Spiegel abfiel, obwohl das Abpumpen noch nicht beendet, und auch der Milchfluß in keinster Weise unterbrochen war. Als Erklärung dieses Phänomens käme eine Entleerung hypophysärer OT - Speicher, eine Zunahme der Erregungsschwelle des neuro - humeralen Reflexes oder ein in seiner neurogenen Erregung anders wirkender taktiler Stimulus des Kindes gegenüber der Milchpumpe in Betracht. Dieser Unterschied findet seinen Ausdruck in der pulsatilen Sekretion von OT beim natürlichen Stillvorgang.

Auf eine derartige pulsatile Sekretion im Abstand von 2- 3 Minuten - eine Freisetzung in sogenannten " spurts " - wies zunächst Chard hin (19). Auch bei uns ließ sich eine episodische Sekretion nachweisen, wenn auch die Spitzen nach dem ersten OT - Maximum kleiner waren. Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Jänicke et al. und Mc Neilly et al. (57,80), sie stehen jedoch im Gegensatz zu Untersuchungen von Dawood et al. (26) und Weitzmann (132), die keine pulsatile Sekretion feststellen konnten. Da bei letzteren die Blutabnahme alle 5 Minuten erfolgte, während wir im Abstand von 2 Minuten OT bestimmten, lassen sich die diskontinuierlichen Befunde mit den unterschiedlichen Blutabnahmezeiten erklären, die

die pulsatile Sekretion verschleiern.

Ein weiterer Streitpunkt in der Diskussion der Physiologie des OT ist das von Benson und Folley eingeführte Konzept, daß OT eine Funktion als Releasing - Hormon für PRL zukomme (8). Bryant und Greenwood bestätigten in ihren Experimenten eine derartige Beziehung (14), die jedoch von Forsling negiert wird (38). Dagegen spricht ebenfalls, daß exogen zugeführtes OT nicht zur Stimulation von PRL führt (97). Auch unsere Ergebnisse unterstützen nicht die These, daß OT die PRL - Sekretion stimuliert. Die PRL - Maxima werden bei der Laktation etwa 20 Minuten nach den OT - Maxima erreicht. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit für OT - nach Lauson 3-6 Minuten (67) - erscheint eine derartige Funktion unwahrscheinlich. Darüberhinaus fanden Wakerley et al, daß die neurale Erregungsschwelle für die OT - Freisetzung von der für PRL differiert, und, daß OT beim Saugakt auch ohne notwendigerweise begleitende PRL - Ausschüttung freigesetzt wird (128). Dies wurde von anderer Seite bestätigt (79). Obwohl also OT ohne PRL beim Saugakt sezerniert werden kann, erscheint das Umgekehrte nicht möglich und die Aktivierung des Milch - Ejektions - Reflexes Voraussetzung für die Auslösung der PRL - Sekretion beim Stillen zu sein. Es wäre demnach denkbar, daß sich Teile des afferenten Schenkels dieses Reflexes im Hypothalamus überlagern und so die Aktivierung der OT - Sekretion einen " Trigger " darstellt für die PRL - Freisetzung. Aus den Abbildungen zur Laktation geht hervor, daß der Beginn des PRL - Anstiegs mit dem OT - Peak zusammenfällt, und, daß die PRL - Maxima immer nach den OT - Maxima erreicht werden. Es kann also die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß OT als " primer " für die PRL - Sekretion eine gewisse Bedeutung zukommt.

Die Ergebnisse der Laktationsstudien für PRL korrelieren gut mit früheren Befunden (36).

Einen TSH - Anstieg beim Saugakt wiesen Blake und Burnet zunächst an der laktierenden Ratte nach (11,16). Dawood berichtete auch bei stillenden Müttern von einem derartigen Ansteigen (26). Unsere Ergebnisse stehen hierzu im Gegensatz. Eine Erhöhung der TSH - Werte während des Stillens war nicht nachweisbar. Wir befinden uns hier in Übereinstimmung mit Gautvik et al., der ebenfalls keinen TSH - Anstieg nachweisen konnte (42). Seit langem ist bekannt, daß TRH in vitro aus der Adenohypophyse der Ratte PRL freisetzt (122) und nachfolgend wurde dieser Zusammenhang auch in vivo bestätigt (91). Die Hypothese einer TRH - Freisetzung während des Stillvorgangs erscheint also attraktiv, zumal auch eine Studie existiert, in der gezeigt werden konnte, daß TRH auch OT zu stimulieren vermag (131). Gegen eine solche Funktion sprechen nicht nur unsere Laktationsstudien, sondern auch der negativ verlaufene TRH - Test. Bei unseren Versuchen kam es nach der

Injektion von 200µg TRH zu keiner Mehrsekretion von OT. Weitzmann konnte zwar mit der Injektion von 100µg TRH/kg beim Kaninchen auch keine Änderung der OT - Spiegel nachweisen, jedoch kam es bei der Infusion von 500µg TRH/kg zu einem signifikanten Anstieg sowohl von OT als auch von ADH. Da wir mit einer Gesamtdosis von 200 µg TRH arbeiteten, einer Konzentration, die ausreicht um TSH und PRL zu stimulieren, läßt sich sagen, daß in diesem Bereich TRH zur Stimulation von OT wirkungslos ist. Die Möglichkeit einer Beeinflussung mit sehr hohen pharmakologischen Dosierungen wurde von uns nicht untersucht und erscheint auch nicht geeignet konkrete Aussagen über die Physiologie der OT - Sekretion zu machen.

Aufgrund der Versuche mit dem erst kürzlich entdeckten Releasing - Hormon GRF ergibt sich folgendes Bild: GRF führt zu einer signifikanten Erhöhung der HGH - Sekretion bei gleichzeitiger Nichtbeeinflussung aller anderer HVL - Hormone (138). Für OT ergaben sich keine stimulierten Werte. Gleiches gilt für den Insulinhypoglykämie - Test. Der ausgelöste Stress führte zur ACTH und HGH - Freisetzung, OT blieb unbeeinflusst.

Bei den Versuchen mit dem Drehstuhl Simulator mit resultierender Reizung des Gleichgewichtsorgans enthielten drei der untersuchten Proben kein OT. Die vierte war jedoch mit 27,8 pg/ml relativ hoch. In Anbetracht der geringen Probandenzahl läßt sich hier noch keine eindeutige Aussage darüber machen, ob die OT - Sekretion durch Vestibularis - Reizung stimulierbar ist. Es erscheint jedoch möglich, daß der Coriolis-Effekt bei bestimmten Individuen zur OT - Ausschüttung führt.

Die Rolle, die OT in der männlichen Reproduktionsendokrinologie spielt, ist kontrovers. Intravenös gegebenes OT erhöht die Spermatozoenzahl im Ejakulat verschiedener Spezies wie dem Kaninchen (33,), dem Schaf (61) oder der Ratte (1). Sharma und Hays fanden nach der Gabe von Methallibure, einem OT - Inhibitor auf hypothalamischer Ebene, die Anzahl der Spermien im Ejakulat um 45 % reduziert und stellten fest, daß dieser Effekt durch die Injektion von OT zu antagonisieren war (112). Beim Menschen liegen derartige Untersuchungen über die Wirkung von OT auf die Spermatozoenzahl für Normalpersonen nicht vor. Es gibt jedoch eine Studie an fünf oligospermischen Männern, die keinen Einfluß auf Qualität und Quantität des Ejakulates erkennen ließ (95). Dagegen zeigten Morton und Fitzpatrick bei ovariectomierten Kaninchen, die künstlich befruchtet worden waren, daß es nach einer kritischen Dosis von 160 pg OT zu massiver transcervikaler Spermienascension kam (88). Dieser Effekt trat sowohl bei höherer Dosierung als auch bei Tieren mit normaler Ovarialfunktion nicht auf, was sie als Hinweis darauf interpretierten, daß der Mechanismus durch hypophysär-ovarielle Feedback - Mechanismen modifiziert wurde. Es ist in diesem

Zusammenhang wichtig anzumerken, daß OT auch bei der Kopulation nachgewiesen worden ist. Debackere, Peeters und Tuytens führten Untersuchungen an Schafen durch, indem sie die vena jugularis des einen Tieres mit dem Gefäß eines anderen laktierenden Tieres verbanden. Bei diesen Kreuz-Zirkulations-Experimenten führte die Massage der vesicula seminalis beziehungsweise der Ampulla des einen Tieres zur Aktivierung des Milch - Ejektions-Reflexes des anderen Tieres (27). Erhöhte OT - Spiegel wurden direkt bei der Kopulation im Blut von Bullen nachgewiesen (64,93). Auch bei weiblichen Versuchstieren fanden sich erhöhte OT - Werte (41,79,101). Bei der Frau gibt es indirekte Hinweise für eine Freisetzung beim Koitus, die sich aus der Beobachtung von Milchabsonderung bei laktierenden Müttern ergeben (49). OT wurde im Serum von Frauen nach Orgasmus auch direkt bestimmt (39) und es ist denkbar, daß die Zunahme der unterinen Kontraktionen, die die vermehrte OT - Sekretion bewirkt, die Aszension der Spermien in die Eileiter direkt unterstützt. Beim Mann liegt eine Studie vor, die über einen signifikanten Anstieg von OT beim Orgasmus berichtet, und die Autoren weisen darauf hin, daß OT bei den Vorgängen um die Ejakulation eine Rolle spiele (92).

Im Seminalplasma wurden bisher eine ganze Reihe von Hormonen nachgewiesen: Man fand unter anderem Testosteron, PRL, PGL, Steroidhormone sowie LH und FSH (87). Mit dem von uns nachgewiesenen OT liegt nun erstmals der Beweis vor, daß Seminalplasma beträchtliche Mengen an OT - in unserem Pool etwa 30 pg/ml - enthält. Nicht zuletzt wegen dieser hohen Konzentration muß man annehmen, daß OT im Samen eine physiologische Aufgabe zukommt. Dem OT dürften dabei im wesentlichen zwei Aufgaben zufallen: Es könnte nach der Ejakulation direkt, lokal auf Uterus und Tube wirken und, verbunden mit einer Reflexausschüttung beim Orgasmus der Frau, durch Erhöhung der Kontraktilität die Aszension der Spermien im weiblichen Genitaltrakt unterstützen. Zum anderen wird OT mit einer vermehrten Aktivität der glatten Muskelzellen akzessorischer Geschlechtsorgane in Verbindung gebracht (54,55,60,81). OT führt in vitro zu einer Zunahme der Kontraktion der tubuli seminiferi (126). Eine derartige Wirkung erklärt auch den erwähnten Effekt von OT auf die Spermatozoenzahl und Ejakulatmenge verschiedener Spezies. Die direkte Wirkung auf tubuli seminiferi und vas deferens dient dem Wiederauffüllen des dukталen Systems zur Vorbereitung für die nächste Ejakulation und ist unabhängig vom spinalen Reflexmechanismus, der zur Ejakulation führt. OT scheint dabei ähnlich wie im Ovar (129, 130) auch von den Zellen des männlichen Reproduktionstrakts lokal synthetisiert zu werden.

Beim hyperprolaktinämischen Hypogonadismus kommt OT keine Bedeutung zu. Obwohl die Sekretion von OT und PRL physiologischer Weise oft parallel verläuft ergaben sich bei den vier Patientinnen mit Mikro- beziehungsweise Makroprolaktinom keine Meßwerte, die oberhalb der basaler Sekretion lagen. Auch die Applikation von Dopaminagonisten und Antagonisten führte zu keiner Mehrsekretion.

Die Befunde der Untersuchung über den Einfluß dopaminerger Substanzen auf OT, PRL und Gonadotropinsekretion sprechen auch gegen Dopamin als Neurotransmitter für OT wie dies von Seybold et al. gefordert wird, der Dopamin ähnlich dem PIF für PRL inhibitorische Funktion zuschreibt (111). Die Ergebnisse in der Literatur hinsichtlich eines neurogenen Transmitters für OT sind sehr diskrepant. Bicknell et al. fand keine Hinweise dafür, daß endogenes Dopamin die OT - Freisetzung beeinflußt (10). Dies stimmt mit unseren Befunden überein, bei denen sowohl unter Dopaminagonisten als auch unter Dopaminantagonisten keine OT - Stimulation meßbar war. Von Reid et al. wurde ein inhibitorischer Einfluß endogener Opiatrezeptoren postuliert. (99). Von Clarke et al. schließlich wurde ein dopaminerger Mechanismus mit distaler alpha-adrenerger Komponente vorgeschlagen (20). Es läßt sich sagen, daß der Regulation der Oxytocin - Sekretion sehr wahrscheinlich ein komplexer Mechanismus zugrunde liegt, der in seiner endgültigen Struktur noch der Abklärung bedarf. Eine alleinige dopaminerge Kontrolle erscheint jedoch nicht vorzuliegen. So spricht auch die fehlende Erhöhung von OT bei Hyperprolaktinämie gegen Dopamin als neurogenen Transmitter, vorausgesetzt die These eines erhöhten hypothalamischen Dopamin- Turnovers erweist sich als richtig.

Obwohl die Verknüpfung von Hyperprolaktinämie und Amenorrhoe seit langem bekannt ist, konnte der zugrunde liegende pathophysiologische Mechanismus bis heute nicht befriedigend erklärt werden (4). Als Ursache abnormer Gonadotropinsekretion stehen sowohl eine periphere Hemmung der ovariellen Steroidsynthese durch die erhöhten PRL - Spiegel, als auch eine zentrale Dysregulation tonischer LH - RH - Neurone durch eine Änderung im dopaminergen Tonus zur Diskussion.

Weitgehende Übereinstimmung besteht dagegen über die Höhe der LH - und FSH - Spiegel. Während sich die FSH - Spiegel praktisch kaum von denen fertiler Frauen unterscheiden (12,53,85), so sind die LH - Konzentrationen erniedrigt beziehungsweise an der unteren Normgrenze (12,53,98). Dies gilt für Mikroprolaktinome und insbesondere für die unter 3.2.1. besprochenen Patientinnen. Dagegen kommt es bei Makroprolaktinomen oft zu einer völligen Supprimierung der Gonadotropine, was sich deutlich bei

der Patientin D.K. bei Punkt 3.2.2. zeigt.

Kontrovers sind die Ergebnisse hinsichtlich exogener LH - RH - Applikation. So konnte sowohl eine fehlende Stimulierbarkeit (100), ein überschießender Anstieg (85) sowie eine alleinige Erhöhung der FSH - Spiegel mit Verschiebung des LH/FSH - Quotienten (66) festgestellt werden. In der Vergangenheit wurde unter anderem zur Erklärung der Pathophysiologie der Hyperprolaktinämie der Vorschlag gemacht, daß sie zur Hemmung ovarieller Funktion führe (90), und sich ein verminderter positiver Feedback auf die Hypophyse beschreiben lasse (3). Gegen solche periphere Effekte als dominierenden Faktor beim hyperprolaktinämischen Hypogonadismus spricht allerdings, daß sich durch exogene E_2 - Gabe kein LH - Peak induzieren läßt (3). Vielmehr läßt sich durch die pulsatile Administration von LH - RH eine Ovulation auslösen, eine zentrale Dysregulation der tonischen LH - RH - Neurone eindringlich dokumentierend (9,71).

Auch die Ergebnisse bezüglich der synaptischen Transmitter, die an der LH - und FSH - Regulation beteiligt sind, differieren beträchtlich. So berichten Leblanc et al., daß die LH - Freisetzung durch eine Dopamin - Infusion gehemmt wird, wohingegen FSH unbeeinflusst bleibt (69). Diese Befunde wurden von zwei anderen Arbeitsgruppen bestätigt (58,70). Andere Autoren jedoch konnten keinen Einfluß von exogenem Dopamin auf die LH - und FSH - Sekretion feststellen (52,115). Nach Gabe des Dopaminantagonisten MC an 17 gesunde Männer ergab sich nach Spitz et al. keine Beeinflussung der Gonadotropine (119). Analoge Ergebnisse fanden auch Quigley et al. bei einer Untersuchung fertiler Frauen (98). Dagegen stellten die selben Autoren eine Stimulation der LH - Werte durch den Dopaminantagonisten MC bei hyperprolaktinämischen Patientinnen fest, einem gesteigerten, zentralen, dopaminergen Tonus eine pathogenetische Rolle zuweisend (98). Unsere eigenen Messungen bei Patientin U.A. ergaben nach MC keine Beeinflussung der Gonadotropinsekretion. Sowohl LH als auch FSH blieb mit Werten um 4 mE/ml respektive 2 mE/ml unverändert. Als unerklärlich erscheint dem - gegenüber der Abfall der LH - und FSH - Spiegel bei Patientin S.F. nach MC - Gabe.

Die Erhöhung der PRL - Sekretion nach MC ist schon lange bekannt (77). Quigley berichtet berichtet bei Hyperprolaktinämikerinnen nur von einem Anstieg von 1/10 dessen, was bei Normalpersonen zu beobachten ist (98). Dies stimmt im wesentlichen mit unseren Messungen überein und steht im Einklang mit dem Konzept eines refraktären Verhaltens laktotropher HVL - Zellen gegenüber einem gesteigerten hypothalamischen Dopamin - Turnovers. Dieses Konzept, demzufolge es durch einen verstärkten hypothalamischen Dopamin - Tonus zur Senkung endogener LH - RH - Sekretion mit daraus resultierenden erniedrigten LH - und FSH - Spiegeln kommt, wurde zunächst an der Ratte demonstriert (56). Nachfolgend wurde es auch beim Menschen

akzeptiert (86).Demnach müßte beim Hyperprolaktinämiker die Gabe des Dopaminantagonisten MC zur Abschwächung des erhöhten zentralen Dopamin - Tonus führen, verbunden mit einer verminderten Hemmung der Pulsatilität der LH - RH - Neurone hätte dies letztlich den Anstieg der peripheren Gonadotropine im Serum zur Folge.Die unter dieser Prämisse paradox erscheinende Senkung der LH - und FSH - Spiegel bei Patientin S.F. ist nicht erklärlich.

Nach Gabe des Dopaminagonisten BC fanden Lachelin et al. bei sechs hyperprolaktinämischen Patientinnen eine signifikante Erniedrigung der LH - und FSH - Werte (66).Evans und Klibanski fanden dagegen keine Veränderung von LH und FSH gegenüber Werten vor der Therapie mit BC (29,59). Dieser Sachverhalt zeigt sich bei unseren Untersuchungen für Patientin S.F. wohingegen es bei Patientin U.A. zu einem deutlichen Ansteigen der Gonadotropine kam.Eine Erklärung hierfür kann in der Verschiedenheit der E_2 - Spiegel vor der BC - Therapie und danach gesucht werden.So betrugen die Werte anfangs 17 pg/ml, waren jedoch zum Zeitpunkt des BC - Versuchs bereits auf 253 pg/ml angestiegen, was auf eine normale Eierstocksfunktion hinweist.BC ist gut in die Therapie der Hyperprolaktinämie eingeführt und seine Wirkungen sind intensiv untersucht worden (96,100,135, 137,139).Die Wirkung von BC scheint im wesentlichen auf folgenden Vorgängen zu beruhen: Parallel zum Abfall der PRL - Spiegel kommt es zur Normalisierung der E_2 - Werte, welche offensichtlich die Ansprechbarkeit der Hypophyse auf LH - RH modifizieren (75).Durch die Senkung der PRL - Spiegel kommt es zu einer Einregulierung der endogenen pulsilen LH - RH - Sekretion, so daß eine Stimulation der ovariellen E_2 -Synthese erfolgen kann.

Von Interesse ist in diesem Zusammenhang die Beziehung zwischen LH - Pulsationen und PRL - Sekretionsmodus.LH - RH - Gabe an Frauen vor der Menopause sowie hypogonaden Patientinnen führt zur PRL - Freisetzung, was auf einen gemeinsamen neuroendokrinen Mechanismus hinweist(17,142).Cetel et al. fanden bei hypogonaden Frauen 95 % der LH - und der PRL - Pulsationen synchron, und folgerten daraus, daß LH - RH einen Abfall der hypothalamischen Dopaminsekretion bewirke, was wiederum die simultane Freisetzung von LH und PRL nach sich zieht (18).Wenn hyperprolaktinämische Patientinnen über einen abnormen dopaminergen Tonus verfügen, so müßten sich hierzu klar Aussagen machen lassen.Wir fanden keine Korrelation zwischen LH - und PRL - Pulsationen vor oder während der BC - Therapie. Beide waren asynchron, wobei die Patientin U.A. unter BC überhaupt keine PRL - Spikes aufwies.Da es bei beiden Patientinnen trotz heterogenen

Sekretionsmustern zur Ovulation kam, unterstreicht, daß die Normalisierung und nicht die Synchronisierung der LH - und PRL - Pulse wichtigstes Kriterium der BC - Wirkung ist.

Kontrovers sind die Aussagen hinsichtlich der LH - Pulsatilität bei Hyperprolaktinämikern. So sollen die meisten Patienten, insbesondere die mit radiologisch verifizierbaren Prolaktinomen, keine LH - Pulsatilität aufweisen (15). Dies trifft bei unseren Untersuchungen auf die beiden Patientinnen mit Makro - Prolaktinomen sowie auf das intraselläre Prolaktinom der Patientin U.A. zu. Moulton et al. dagegen fanden bei sechs Patienten LH - Pulse mit hoher Amplitude und mit unregelmäßiger Periode (89). Wenn Makro - Prolaktinome ausgeschlossen wurden, konnten Klibanski et al. keine Korrelation zwischen LH - Pulshäufigkeit und der Höhe der PRL - Spiegel nachweisen. Die tonische LH - Sekretion mancher ihrer Patientinnen unterschied sich sogar nicht von der gesunder Frauen in der follikulären Phase (59). Diese Aussage läßt sich bei den von uns untersuchten Patientinnen auch für Frau S.F. machen. Sicher ist, daß man zwischen Patientinnen mit Makro - und Mikro - Prolaktinomen unterscheiden muß. Bei letzteren scheint eine subtilere Art der Alteration der Gonadotropinsekretion vorzuliegen und ein abnormer E_2 - Feedback auf die Hypophyse möglich, der den ovulatorischen LH - Anstieg verhindert.

Die Möglichkeit der Induktion der Ovulation durch tonische LH - RH - Gabe (Zyklomat, Fa. Ferring) bei hyperprolaktinämischen Patienten zeigt die Wichtigkeit, die der gestörten LH - Pulsatilität bei diesem Krankheitsbild zukommt. (9,71,72). Dies wird durch unsere beiden Patientinnen mit therapieresistentem Makro - Prolaktinom untermauert, bei denen es während der LH - RH - Behandlung zur Ovulation mit nachfolgender Schwangerschaft gekommen ist. Die pulsatile Gn - RH - Substitution ist also auch bei sehr hohen PRL - Spiegeln in der Lage eine physiologische Ovarialfunktion zu induzieren. Die These einer primär peripheren Wirkung der Hyperprolaktinämie im Sinne einer Inhibition der follikulären Steroidogenese dürfte somit von geringer Bedeutung sein (123). Nach den bisher veröffentlichten Erfolgen mit der pulsatischen LH - RH - Therapie bei moderater Hyperprolaktinämie (9,71), ist es uns gelungen bei zwei Patientinnen mit Makro - Prolaktinomen, die partiell hypophysenvorderlappeninsuffizient waren, Schwangerschaften zu erzielen. Dies veranschaulicht, daß auch bei Makro - Prolaktinomen der funktionelle Aspekt der Genese des Hypogonadismus ganz im Vordergrund steht. Auch bei der hyperprolaktinämischen Ovarialinsuffizienz mit sehr hohen Prolaktinkonzentrationen kann also diese Form der Therapie erfolgreich eingesetzt werden.

5. Zusammenfassung

1. Im ersten, methodischen Teil der Arbeit werden die Radioimmunoassays zur Bestimmung von OT, PRL, LH, FSH, E_2 und PROG beschrieben. Besonderes Gewicht wird auf den OT - RIA gelegt, da es sich um einen Neuaufbau handelt. Nach Lösung der Probleme wie Wahl des geeigneten Antikörpers, Optimierung der Extraktion und Inaktivierung der Oxytocinase lag die untere Nachweisgrenze mit 1-2 pg/ml im Bereich basaler OT - Normalspiegel.
2. Mit Hilfe des OT - RIA wurde das Verhalten von OT während des ovulatorischen Zyklus fertiler Frauen untersucht. Es fand sich kein zyklisches Verhalten der OT - Sekretion, weder ein Peak in Zyklusmitte noch eine OT- Erhöhung während der Follikel - oder Luteal- Phase.
3. Die Untersuchungen über die Regulation der OT - Sekretion ergaben, daß OT bei der Laktation zweigipflig anstieg, wogegen das PRL einen trägen, verlängerten Anstieg aufwies. Eine TSH - Freisetzung während des Saug - reflexes konnte nicht beobachtet werden. Reize wie TRH-, GRF-, IHT- Test sowie die akute Stimulation des Gleichgewichtsorgans (Kinetose) führten zu keiner Mehrsekretion von OT.
4. Im letzten Teil der Arbeit wird die Pathophysiologie der Hyperprolaktinämie untersucht. Die Ergebnisse zeigen, daß OT bei der Genese des hyper - prolaktinämischen Hypogonadismus keine Bedeutung zukommt. Um die These eines zentral erhöhten dopaminergen Tonus bei diesem Krankheitsbild und seine Auswirkung auf die Gonadotropinsekretion zu überprüfen, wurde der Einfluß von Dopaminagonisten und DA - Antagonisten auf die LH-, FSH- und PRL - Sekretion bei zwei Hyperprolaktinämikerinnen untersucht. Die These eines gesteigerten Dopamin - Turnovers als Ursache des hypothalamischen Hypogonadismus konnte nicht bewiesen werden. Allerdings konnte gezeigt werden, daß die erhöhten PRL - Spiegel die pulsatile Gonadotropinsekretion unterdrücken. Zwei Patientinnen mit therapierefraktären Prolaktinomen wurden mit pulsatilem Gn- RH - Applikation substituiert. Durch diese Therapie konnten jeweils Ovulationen mit nachfolgenden Schwangerschaften ausgelöst werden. Die postulierte periphere Wirkung hoher PRL - Spiegel im Sinne einer Inhibition der follikulären Steroidogenese scheint somit keine große Rolle für die Genese des Hypogonadismus zu spielen.

6. Summary

1. In the first part radioimmunological methods for the measurement of OT, PRL, LH, FSH, E_2 and PROG are presented. Special emphasis is given to the oxytocin assay by means of which also basal secretion in the range of 1- 2 pg/ml can be detected. For that purpose several problems like selection of a specific antibody, suitable extraction of OT from the serum and inhibition of the oxytocinase had to be overcome.
2. In clinical application the serum profile of OT during the ovulatory cycle in fertile women was studied. There was no mid-cycle peak appreciable nor were there any values different from normal basal levels in the follicular and luteal phase of the cycle.
The studies concerning the regulation of the OT- secretion showed that during breast feeding OT is released in spurts every two or three minutes, whereas PRL shows a slow but steady rise to one peak. There was no TSH-release demonstrable. Manoeuvres like TRH-, GRF-, and the insulin induced hypoglycemia test as well as the acute stimulation of the vestibular organ - causing motion sickness - did not increase OT - levels.
3. The last part is devoted to the study of the pathophysiology of hyperprolactinemia. Our data show that OT does not play a role in the pathogenesis of hyperprolactinemic hypogonadism. The influence of dopamine agonists and DA - antagonists were studied in women with the amenorrhea- galactorrhea-syndrome. Although there was no evidence for an increased central dopaminergic tone in these patients an inhibition of the pulsatile secretion of gonadotropins by elevated PRL - levels could be demonstrated. Thus exogenous Gn-RH induced regular ovulatory cycles in two patients with macro-prolactinomas leading to subsequent pregnancies.

Literaturverzeichnis

1. Agmo,A., Andersson,R., Johansson,C.
Effect of oxytocin on sperm numbers in spontaneous rat ejaculates
Biol.Reprod. 18, 346 (1978)
2. Amico,J.A., Seif,S.M., Robinson, A.G.
Oxytocin in human plasma: correlation with neurophysin and stimulation with estrogen
J.Clin.Endocrinol.Metab. 52, 988 (1981)
- 3.Aono,T., Miyake, A., Shioji,T., Kinugara,T., Onishi,T., Kurachi, K.
Impaired LH - release following exogenous estrogen administration in patients with amenorrhea- galactorrhea syndrome
4. Argonz,J., de Castillo,E.B.
A syndrome characterized by estrogenic insufficiency, galactorrhea and decreased urinary gonadotropins
J.clin.Endocrinol. 13, 79 (1953)
5. Armstrong,D.T., Hansel, W.
Alteration of bovine estrous cycle with oxytocin
J.Dairy Sci. 42, 533 (1959)
6. Bardin,C.W., Paulsen, C.A.
The testes, p. 293 - 344
in : Textbook of Endocrinology, edited by Robert H. Williams
Saunders Company,Philadelphia London Toronto (1981)
7. Bargmann,W., Scharrer,E.
The site of origine of the hormones of the posterior pituitary
Am. Scientist 39, 255 (1951)
8. Benson,G.K., Folley,S.J.
The effect of oxytocin on mammary gland involution :study in hypophysectomized rats.
J.Endocrinol. 22 , 207 (1957)
9. Berg,D., Rijosk, H.K., Jänicke, F., von Werder, K.
Behandlung der hyperprolaktinämischen Amenorrhoe durch pulsatile Gabe von Gonadotropin - Releasing - Hormon
Geburtsh. u. Frauenheilk. 43, 686 (1983)
- 10.Bicknell,R.J., Leng, G.
Endogenous opiates regulate OT but not vasopressin secretion from the neurohypophysis
Nature 298, 161 (1982)

- 11.Blake, C.A.
Stimulation of pituitary PRL and TSH - release in lactating and
proestrous rats
- 12.Bohnet,H.G., Dahlen, H.G., Wuttke,W., Schneider, H.P.G.
Hyperprolactinemic anovulatory syndrome
J.clin.Endocrinol. 42, 132 (1975)
- 13.Brownstein, M.J.,Russel, J.T., Gainer ,H.
Synthesis ,Transport and release of posterior pituitary hormones
Science 207, 373 (1980)
- 14.Bryant, G.D., Linzell, J.C. Greenwood, T.C.
Plasma PRL- release in goats measured by radioimmunoassay :The
effect of teat-stimulation, mating behaviour, stress, fasting
and of OT, insulin and glucose injections
Hormones 1, 26 (1970)
- 15.Buckman ,M.T., Peake, G.T., Srivastara, L.
Patterns of spontaneous LH - release in normal and hyperprolac -
tinemic women
Acta Endocrinol. (Kbh) 97, 305 (1981)
- 16.Burnet, F.R., Wakerley, R.
Plasma PRL and TSH during suckling in urethane anaesthetized rats.
J.Endocrinol. 70, 429 (1976)
- 17.Casper,R.F., Yen, S.S.C.
Spontaneous pulsatile release of PRL and LH induced by LH - RH -
agonist
J.Clin.Endocrinol.Metab. 52, 934 (1981)
- 18.Cetel, N.S., Yen, S.S.C.
Concomitant pulsatile release of prolactin and luteinizing hormone
in hypogonadal women
J.Clin.Endocrinol. 56, 1313 (1983)
- 19.Chard, T., Boyd, N.R.H., Forsling, M.L., Mc Neilly, A.S., Landon, J.
The development of a radioimmunoassay for oxytocin: The extraction
of oxytocin from plasma and its measurement during parturition
in human and goat blood
J.Endocrinol. 48, 223 (1978)
- 20.Clarke,G. , Lincoln, D.W., Merrick, L.P.
Dopaminergic control of OT - release in lactating rats
J.Endocrinol. 83, 409 (1979)

- 21.Coch,J.A., Fielitz,C., Bovetto, J., Cabot,H.M., Loda, H., Fraga, A.
Estimation of an OT - like substance in highly purified extracts
from the blood of puerperal women during suckling
J.Endocrinol. 40, 137 (1968)
- 22.Cowie, A.T., Forsyth, I.A., Hart, I.C.
Early studies on the nature of milk ejection
in: Hormonal control of lactation p. 189 - 192
Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York (1980)
- 23.Daughaday, W.H.
The Adenohypophysis , pp.73 - 114
in: Textbook of Endocrinology, edited by Robert H. Williams
Saunders Company, Philadelphia London Toronto, (1981)
- 24.Dawood, M.Y., Raghavan,K.S., Pociask, C.
Radioimmunoassay of Oxytocin
J.Endocrinol. 76, 261 (1978)
- 25.Dawood,M.Y., Ylikorkala,O., Trivedi, D., Gupta, R.
Oxytocin levels and plasma disappearance rate and plasma FSH and
LH after oxytocin- infusion in men.
J.Endocrinol. 50, 397 (1980)
- 26.Dawood,M.Y., Khan- Dawood,F.S.,Wahi, R.S., Fuchs, F.
Oxytocin release and plasma anterior pituitary and gonadal hormones
in women during lactation
J.Clin.Endocrinol.Metab. 52, 678 (1981)
- 27.Debackere, M., Peeters, G., Tuytens, N.
Reflex release of oxytocin hormone by stimulation of genital organs
in male and female sheep studied by cross - circulation technique
J.Endocrinol. 22, 321 (1961)
- 28.Ely,F., Petersen, W.E.
The ejection of milk from the mammary gland
J.Dairy Sci. 23 , 536 (1940)
- 29.Evans,W.S., Rogol,A.D., McLeod,R.M., Thorner, M.O.
Dopaminergic mechanisms and luteinizing hormone secretion.Acute
administration of the dopamine agonist bromocryptine does not
inhibit luteinizing hormone release in hyperprolactinemic women.
J.Clin.Endocrinol. 50, 103 (1980)
- 30.Eversmann,T., Gottsmann,M.,Uhlich,E., Ulbrecht,G., von Werder,K.,Scriba,P.C.
Increased secretion of growth hormone,prolactin,antidiuretic hormone
and cortisol induced by the stress of motion sickness
Aviation, Space and Environmental Medicine 49, 53 (1978)

31. Erhardt, Marschner, Pickardt, Scriba, P.C.
Verbesserung der Qualitätskontrolle der radioimmunologischen
Thyreotropinbestimmung
Z.Klin.Chem.Klin.Biochem. 11, 381 (1973)
32. Ferguson, J.K.W.
A study of the motility of the intact uterus at term
Surg.Gynecol.Obstet 73, 359 (1941)
33. Fjelstrom, D., Kihlstrom, J.E., Melin, P.
The effect of synthetic OT upon seminal characteristics and sexual
behavior in male rabbits
J.Reprod.Fertil. 17, 207 (1968)
34. Flint, A.P.F., Mitchell, M.D., Sheldrick, E.L.
Delayed luteal regression in ewes immunized against OT
Proc.Physiol.Soc. (London) 7, 85 (1979)
35. Flint, A.P.F., Sheldrick, E.L.
Ovarian secretion of OT is stimulated by prostaglandins
Nature 297, 587 (1982)
36. Flückiger, E., del Pozo, E., von Werder, K.
Prolactin. Physiology, pharmacology and clinical findings
Monographs on Endocrinology, Springer Verlag,
Berlin Heidelberg New York (1982)
37. Folley, S.J.
The milk - ejection reflex: The neuroendocrine theme in biology,
myth and art.
The Sir Henry Dale Lecture for 1969
J. Endocrinol. 44, x - xx (1969)
38. Forsling, M.L., Reinhardt, W., Himmler, V.
Neurohypophysial hormones and PRL - release
J.Endocrinol. 63, 579 (1974)
39. Fox, C.A., Knaggs, G.S.
Milk ejection activity (oxytocin) in peripheral venous blood in
man during lactation and in association with coitus
J.Endocrinol. 45, 145 (1969)
40. Franchimont, P., Legros, J.J.
Influence des hormones hypophysaires sur le tanié de la somatotro -
phine et des gonadotrophines chez l'homme
Ann.Endocrinol. (Paris) 30, 125 (1969)

41. Fuchs, A.R., Cubile, L., Dawood, M.Y.
Effects of mating on levels of OT and PRL in the plasma of male and female rabbits
J. Endocrinol. 90 , 245 (1981)
42. Gautvik, K.M., Weintraub, B.D., Graeber, C.T., Maloof, F., Zimmermann, J.E., Tashjian, A.H.
Serum PRL and TSH : Effect of nursing and Pyro-Glu-His-ProNH₂ administration in postpartum women
J. Clin. Endocrinol. 36, 135 (1973)
43. Gibbs, D.
High concentrations of oxytocin in hypophyseal portal plasma
Endocrinology 114 , 1216 (1984)
44. Gillespie, A., Brummer, H.C., Chard, T.
Oxytocin release by infused prostaglandins
Br. Med. J. 1 , 543 (1972)
45. Gilliland, P.F., Prout, T.E.
Immunologic studies of octapeptides. Production and detection of antibodies to oxytocin
Metabolism 14 , 918 (1965)
46. Gorewit, R.C.
Method for determining oxytocin concentrations in unextracted sera, characterization in lactating cattle
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 160 , 80 (1979)
47. Griffiths, E.C., Hooper, F.C.
Competitive inhibition between oxytocin and luteinizing hormone releasing factor (LRF) for the same enzyme in the rat hypothalamus
Acta Endocrinol. (Kbh) 75 , 435 (1974)
48. Guillemin, R., Brazeau, P., Böhlen, P., Esch, F., Ling, N., Wahrenberg, W.B.
Growth hormone releasing factor from a human pancreatic tumor that caused acromegaly
Science 218 , 585 (1982)
49. Harris, G.W., Pickles, V.R.C.
Reflex stimulation of the neurohypophysis and the nature of posterior pituitary hormones
Nature 172, 1049 (1953)
50. Hawker, J.P., Bohnet, H.G., Mühlenstedt, D., Nowack, C., Schneider, H.P.G.
Gonadotropin release during chronic administration of D-Ser-(TBU)⁶-Lh-RH-EA in functional amenorrhea
Acta Endocrinol. 89 , 625 (1978)

51. Hawker, R.W.
OT in lactating and non-lactating women
J.Clin.Endocrinol 18 , 54 (1958)
52. Hayek, A., Crawford, J.D.
L-Dopa and pituitary hormones secretion
J.Clin.Endocrinol. 34 , 764 (1972)
53. Healy, D.L., Repperell, R.J., Stockdale, J., Bremner, W.J., Burger, H.G.
Pituitary autonomy in hyperprolactinemic secondary amenorrhea :
results of hypothalamic pituitary testing
J.Clin.Endocrinol. 44 , 809 (1977)
54. Hib, J.
The contractility of the cauda epididymis of the mouse, its spontaneous activity in vitro and the effect of oxytocin
J.Reprod.Fertil. 36 , 191 (1974)
55. Hib, J.
In vivo effects of oxytocin and vasopressin on spontaneous contractility of the rat epididymis
Int.J.Fertil. 22 , 63 (1977)
56. Hökfelt, T., Fuxe, K.
Effects of prolactin and ergot alkaloids on the tubero - infundibular dopamine (DA) neurons
Neuroendocrinology 9 , 100 (1972)
57. Jänicke, F., Rijosk, H.K., von Werder, K.
Oxytocin secretion in response to suckling in lactating women
Acta Endocrinol. (Kbh) Suppl. 264 , 134 (1984)
58. Judd, S.J., Rakoff, J.S., Yen, S.S.C.
Inhibition of prolactin and oxytocin release by dopamine: effect of endogenous estrogen levels
J.Clin.Endocrinol. 47, 494 (1978)
59. Klibanski, A., Bertins, J.Z., Merriam, G.R., Mc Arthur, J.W., Zervas, N.T., Ridgway, E.C.
Gonadotropin and PRL pulsations in hyperprolactinemic women before and during BC therapy
J.Clin.Endocrinol.Metab. 58 , 1141 (1984)
60. Knight, T.W.
In vivo effects on the contractile activity of the cannulated epididymis and vas deferens in rams
J.Reprod.Fertil. 28 , 141 (1972)

61.Knight, T.W.

The effect of oxytocin and adrenaline on the semen output of rams
J.Reprod.Fertil. 39 , 329 (1974)

62.Knobil, E., Plant,T.H.

Neuroendocrine control of gonadotropin secretion in the female
rhesus monkey
in:Frontiers of Neuroendocrinology, Vol. 15, pp 249 - 264
Ganong,Martini (Eds.), Raven Press, New York (1978)

63.Knobil, E.

The neuroendocrine control of the menstrual cycle
Recent Prog.Horm.Res. 36 , 53 (1980)

64.Kumaresan,P., Weathersbee,P.S., Lodge,J.R.

Effect of ejaculation on plasma OT levels in dairy bulls
Fed.Proc. 38 , 979 (1979)

65.Labhart, A.

Klinik der Inneren Sekretion
3. Aufl. Springer Verlag ,Berlin 1978

66.Lachelin,G.C.L., Leblanc,H., Yen, S.S.C.

The inhibitory effect of dopamine agonists on LH release in women
J.Clin.Endocrinol.Metab. 44 , 728 (1977)

67.Lauson, H.D.

Metabolism of neurohypophysial hormones
in:handbook of physiology,sect.7,Endocrinology,Vol.IV,The pituitary
gland, p.287 , Knobil,E.,Sawyer ,W.E.,(eds) Washington,
Am.Physiol.Society 1974

68.Leake ,R.D., Weitzmann,R.E., Glotz,T.H., Fisher,D.A.

Plasma oxytocin concentrations in men, nonpregnant women and pregnant
women before and during spontaneous labor.
J.Clin.Endocrinol.Metab. 53 , 730 (1981)

69.Leblanc, H., Lachelin,G.C.L., AbuFadil,S., Yen,S.S.C.

Effects of dopamine infusion on pituitary hormone secretion in humans
J.clin.Endocrinol. 43 , 668 (1976)

70.Leebaw,W.F., Lee,L.A., Woolf,P.D.

Dopamine effects and augmented pituitary hormone secretion
J.Clin.Endocrinol. 47 , 480 (1978)

71.Leyendecker,G., Strüwe,T., Plotz, E.J.

Induction of ovulation with chronic intermittent administration of
LH - RH in women with hypothalamic and hyperprolactinemic amenorrhea
Arch.Gynaecol. 229 , 177 (1980)

72. Leyendecker, G., Wildt, L., Hansmann, M.
Pregnancies following chronic intermittent (pulsatile) administration of Gn-RH by means of a portable pump (" Zyklomat ") - a new approach to the treatment of infertility in hypothalamic amenorrhea.
J.Clin.Endocrinol. 51 , 1214 (1980)
73. Leyendecker, G., Wildt, L.
Die pulsatile Therapie mit Gonadotropin Releasing Hormon (Gn-RH)
Geburtsh. und Frauenheilk. 42 , 689 (1982)
74. Lucas, A., Drewett, R.B., Mitchell, M.D.
Breast feeding and plasma oxytocin concentrations
Br.Med.J. 281 , 834 (1980)
75. Ludwig, W., Bock, L., Buchner, A., Eversmann, T., Rijosk, H.R., von Warder, K.
Effect of bromocryptine and metoclopramide on LH - RH - stimulated gonadotropin secretion in hyperprolactinemic patients
Acta Endocrinol. (Kbh) 99 Suppl. 246 , 150 (1982)
76. Lumpkin, M.D., Samson, W.K., Mc Cann, S.M.
Hypothalamus and pituitary sites of action of OT to alter PRL - secretion in the rat
Endocrinology 112 , 1711 (1983)
77. Mc Callum, R.W. , Sowers, J.R., Hershman, J.M., Sturdevant , R.A.
Metoclopramide stimulates prolactin secretion in man
J.Clin.Endocrinol. 42 , 1148 (1976)
78. Mc Cracken, J.A., Carlson, J.C., Glew, M.E., Goding, J.R., Baird, D.T., Green, K. Samuelsson, B.
Prostaglandin F_{2a} identified as a luteolytic hormone in sheep
Nature 238 , 129 (1972)
79. Mc Neilly, A., Folley, S.J.
Blood levels of milk - ejection activity (oxytocin) in the female goat during mating
J.Endocrinol. 48 , ix (1979)
80. Mc Neilly , A., Robinson, I.C.A.F., Houston , M.J., Howie, P.W.
Release of OT and PRL in response to suckling
Br.Med.J. 286 , 257 (1983)
81. Melin, P.
Effects in vivo of neurohypophysial hormones on the contractile activity of accessory sex organs in male rabbits
J.Reprod.Fertil. 22 , 283 (1970)

- 82.Mitchell,M.D., Flint,A.P.F., Turnbull,A.C.
Stimulation by oxytocin of prostaglandin F levels in uterine venous
effluent in pregnant and puerperal sheep
Prostaglandins 9 , 47 (1975)
- 83.Mitchell,M.D., Haynes,P.J., Anderson,A.B.M., Turnbull,A.C.
OT in human ovulation
Lancet 704 , ii (1980)
- 84.Mitchell,M.D., Haynes,P.J., Anderson,A.B.M., Turnbull,A.C.
Plasma OT during the menstrual cycle
Europ.J.Obstet.Gyn.Reprod.Biol. 12 , 195 (1981)
- 85.Monroe, S.E., Levine ,L., Chang,R.J., Keye,W.R., Yamamoto,M.,Jaffe,R.B.
Prolactin secreting pituitary adenomas.Increased gonadotroph
responsivity in hyperprolactinemic women with pituitary adenomas
J.Endocrinol.Metab. 52, 1171 (1981)
- 86.Moore,K.E., Demares,K.T., Johnston,C.A.
Influence of PRL on dopaminergic neuronal systems in the hypothalamus
Fed.Proc. 39 , 2912 (1980)
- 87.Moreno-Escallon,B., Ridley,A.J., Wu,C.H., Blasco, L.
Hormones in seminal plasma
Archives of Andrology 9 , 127 (1982)
- 88.Morton,D.B.,Fitzpatrick,R.J.
The effect of oxytocin on sperm transport in ovariectomized,
oestrogen treated rabbits
J.Endocrinol. 61 , 139 (1974)
- 89.Moult,P.D.A.,Rees, L.H., Besser, G.M.
Pulsatile gonadotropin secretion in hyperprolactinemic amenorrhea
and response to bromocryptine therapy
Clinic.Endocrinol. 16 , 153 (1982)
- 90.Mrough,A., Iler - Khodr,S.
Ovarian refractoriness to gonadotropins in cases of inappropriate
lactation : restoration of ovarian function with bromocryptine
J.Clin.Endocrinol. 43 , 1398 (1976)
- 91.Mueller,G.P., Chen,H.J., Meites ,J.
In vivo stimulation of PRL release in the rat by synthetic TRH
Proc.Soc.Exp.Biol.Med. 144, 613 (1973)
- 92.Ogawa ,S.,Kudo,S., Kitsumai,Y., Fukuchi, S.
Increase in OT - secretion at ejaculation in male
Clin.Endocrinol. 13 , 95 (1980)

93. Peeters, G., Legros, J.J., Piron-Bossuyt, C., Reynaert, R., Vanden Driessche, R.
Vannieuwenhuysse, E.
Release of neurophysin I and stimulation of the genital organs in bulls
J. Endocrinol. 99 , 161 (1983)
94. Piron -Bossuyt, C., Bossuyt, H., Brauman, H., Vanden Driessche, R.
Development of a radioimmunoassay for Oxytocin
Ann. Endocrinol. (Paris) 27 , 389 (1976)
95. Powers, P.E., Derrick, F.C. Jr., Jonsson, H.T. Jr.
Lack of oxytocin effect on sperm output in oligospermic males
Urology 19 , 523 (1982)
96. del Pozo, E., Varga, L., Wyss, H., Tolis, G., Friesen, H., Wenner, R., Vetter, L.
Kettwiler, A.
Clinical and hormonal response to BC (CB - 154) in the galactorrhea
syndrome
J. Clin. Endocrinol. 39 , 18 (1974)
97. del Pozo, E., Kleinstein, J., Brun del Re, R., Derrer, F., Martin-Perez, J.
Failure of OT and Lysine-Vasopressin to stimulate OT-release in humans
Hormon. Metab. Res. 12 , 26 (1980)
98. Quigley, M.F., Judd, S.J., Gilliland, G.B., Yen, S.S.C.
Effect of dopamine antagonist on the release of gonadotropin and
prolactin in normal women and women with hyperprolactinemic anovulation
J. Clin. Endocrinol. Metab. 48 , 718 (1979)
99. Reid, R.L., Yen, S.S.C., Artman, H., Fisher, D.A.
Effects of synthetic Beta - endorphin on release of neurohypophyseal
hormones
Lancet 21 Nov , 1169 (1981)
100. Rijosk, H.K., von Werder, K., Fahlbusch, R.
Hyperprolaktinämische Amenorrhoe. Klinische Bedeutung, endokrine
Befunde, Therapie
Geburtsh. u. Frauenheilk. 36 , 575 (1976)
101. Roberts, J.S., Share, L.
Oxytocin in plasma of pregnant, lactating and cycling ewes during
vaginal stimulation
Endocrinology 83 , 272 (1968)
102. Robinson, A.G.
Neurophysins
pp 585 -601 in: Clinical Endocrinology
eds. Martini, Besser, New York Academic Press 1977

103. Roca, R.A., Garofalo, E.G., Martino, I., Piriz, H., Rieppi, G., Maraffi, M., Ohanian, C., Gadola, L.
Effects of OT antiserum and of indomethacin on HCG - induced ovulation in the rabbit
Biol.Reprod. 19, 552 (1978)
104. Sachs, H., Takabatake, Y.
Endocrinology 75, 939 (1964)
105. Sala, N., Althabe, O.
The milk ejecting effect induced by OT during human lactation
Acta Physiol.Lat.Am 18, 88 (1968)
106. Scanlon, M.F., Rodriguez-Arnan, M.D., McGregor, A.M., Weightman, D., Lewis, M., Cook, D.B., Gomez-Pan, A., Hall, R.
Altered dopaminergic regulation of thyrotrophin release in patients with prolactinoma. Comparison of other tests of hypothalamic pituitary function
Clin.Endocrinol. 14, 133 (1981)
107. Schams, D., Schmidt-Polex, B., Kruse, V.
Oxytocin determination by radioimmunoassay in cattle
Acta Endocrinol. (Kbh) 92, 258 (1979)
108. Schams, D., Prokopp, A., Schmidt-Adamopoulou, B.
The effect of active immunization against OT and ovarian cyclicity in ewes
Acta Endocrinol (Kbh) 99, 246 (1982)
109. Schams, D.,
Oxytocin determination by radioimmunoassay. III. Improvement to sub - picogram sensitivity and application to blood levels in cyclic cattle
Acta Endocrinol (Kbh) 103, 180 (1983)
110. Scriba, P.C., von Werder, K.
Hypothalamus und Hypophyse
in: Klinische Pathophysiologie, S.294 -329, Herausgeber W.Siegenthaler
Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 1982
111. Seybold, V.S., Miller, J.W., Lewis, P.R.
Investigation of a dopaminergic mechanism for regulating OT-release
J.Pharmacol.Exp.Therap. 207, 605 (1978)
112. Sharma, O.P., Hays, R.L.
A possible role for oxytocin in the sperm transport of the male rabbit
J.Endocrinol. 68, 43 (1976)
113. Sharma, S.C., Fitzpatrick, R.J.
Effect of oestradiol -17 β and OT treatment on PGL Fa release in the anoestrous ewe
Prostaglandins 6, 97 (1974)

114. Sheldrick, E.L., Mitchell, M.D., Flint, A.P.F.
Delayed luteal regression in ewes immunized against oxytocin
J.Reprod Fertil. 59 , 37 (1980)
115. Sinhamapatra, S.B., Kirschner, M.A.
Effect of L-dopa on testosterone and luteinizing hormone production
J.Clin.Endocrinol. 34 , 756 (1972)
116. Small, C.W., Watkins, W.B.
Glutathione - oxytocin transhydrogenase of human placental origin
with specificity towards neurohypophysial hormones
Nature 251 , 238 (1974)
117. Sofroniew, M.V.
Projections from vasopressin, oxytocin and neurophysin to neural
targets in the rat and human
J.Histochem.Cytochem. 28 , 475 (1980)
118. Soloff, M.S.
Oxytocin receptors in the rat oviduct
Biochem.Biophys.Res.Comm. 66 , 671 (1975)
119. Spitz, I.M., Trestian, S., Cohen, H., Arnon, N., Le Roith, D.
Failure of metoclopramide to influence LH, FSH and TSH secretion
or their response to releasing hormones
Acta Endocrinol. (Kbh) 92 , 640 (1979)
120. Stern-Borda, L., Borda, E., Gimeno, M.F., Gimeno, A.L.
Spontaneous and prostaglandin or oxytocin induced motility of
rat oviduct isolated during different stages of the estrous cycle,
effect of norepinephrine
Fertil.Steril. 27 , 319 (1976)
121. Tan, G.J.S., Tweedale, R., Biggs, J.S.G.
Oxytocin may have a role in the regulation of the corpus luteum
J.Steroid.Biochem. 14 , xiii (1981)
122. Tashjian, A.H., Barowsky, N.J., Jensen, D.K.
Thyrotropin releasing Hormone direct evidence for stimulation of
prolactin production by pituitary cells in culture
Biochem.Biophys.Res.Comm. 43 , 516 (1971)
123. Thorner, M.D.
Prolactin, clinical physiology and the significance and management
of hyperprolactinemia
in: Clinical Neuroendocrinology, p.319, Martini, Besser (eds.)
Academic Press, New York , San Francisco , London (1977)

124. Thorner, M.O., Perryman, R.L., Cronin, M.J., Rogol, A.D., Draznin, M., Johanson, A., Vale, W., Horvath, E., Kovacs, K.
Somatotroph hyperplasia: successful treatment of acromegaly by removal of a pancreatic islet tumor secreting a growth hormone releasing factor
J.Clin.Invest. 70 , 965 (1982)
125. Tindal, S.
Stimuli that cause the release of oxytocin
in: Handbook of Physiology, Vol. VI, Pituitary Gland, pp. 257 - 267
Knobil, Sawyer (eds.), Am. Physiol. Soc., Washington (1974)
126. Vogelmayr, J.K.
Output of spermatozoa and fluid by the testis by the ram and its response to oxytocin
J.Reprod.Fertil. 43 , 119 (1975)
127. Voigt, K.H., Fehm, H.L.
Behavioral effects of neuropeptides in man: Psychological and neurophysiological studies
in: Workshop , Clinical Aspects of the Hypothalamus, pp 27 - 28
abstract book, von Erder, K., Fahlbusch, R. (eds.), Munich 1983
128. Wakerley, J.B., O'Neill, D.S., Ter Haar, M.B.
Relationship between the suckling induced release of oxytocin and prolactin in the urethane anaesthetized rat
J.Endocrinol. 76 , 493 (1978)
129. Wathes, D.C., Pickering, B.T., Swann, R.W., Potter, D.G.
Neurohypophysial hormones in the human ovary
Lancet August 21 , 410 (1982)
130. Wathes, D.C., Swann, R.W.
Is oxytocin an ovarian hormone
Nature 297 , 225 (1982)
131. Weitzmann, R.E., Firemark, H.M., Glatz, T.H., Fisher, D.A.
TRH stimulates release of arginine vasopressin and oxytocin in vivo
Endocrinology 104 , 904 (1979)
132. Weitzmann, R.E., Leake, R.D., Rubin, T.R., Fisher, T.A.
The effect of nursing on neurohypophysial hormone and prolactin secretion in human subjects
133. von Werder, K.
Wachstumshormon und Prolaktinsekretion des Menschen
Physiologie und Pathophysiologie
Urban & Schwarzenberg Verlag, München (1975)

- 134.von Werder,K., Felixberger,F. Gottsmann,M., Kerner,W., Glöckner,B.
A homologous human prolactin (hPRL) radioimmunoassay with an
antibody against " little " oxytocin
Proceedings of the IAEA - Symposium, Berlin, 1977
Radioimmunoassay and related procedures in medicine
Vol.I p.43 (1978)
- 135.von Werder, K., Fahlbusch,R., Landgraf,R., Pickardt,C.R.,Rjosk,,H.K.
Scriba,P.C.
Treatment of patients with prolactinomas
J.Endocrinol.Invest. 1 , 47 (1978)
- 136.von Werder, K., Rjosk,H.K.
Menschliches Prolaktin
Klin.Wschr. 57 , 1 (1979)
- 137.von Werder,K., Eversmann, T., Rjosk,H.K., Fahlbusch,R.
Treatment of hyperprolactinemia
in:Frontiers of Neuroendocrinology,Ganong,W.F.,Martini,L. (eds.)
Raven Press, New York (1982)
- 138.von Werder,K., Müller,O.A., Hartl,R.,Losa,M., Stalla,G.K.
Growth hormone releasing factor (GRF) -stimulation test in
normal control and acromegalic patients
J.Endocrinol.Invest. 7 , 185 (1984)
- 139.von Werder,K.
Recent advances in the diagnosis and treatment of hyperprolactinemia
in:The pituitary gland,H.Imura (ed.) pp. 405 - 439
Raven Press New York (1985)
- 140.van Wimersma Greidanus,T.B., de Wied,D.
Hypothalamic Neuropeptides and memory
in:Workshop ,clinical aspects of the hypothalamus,abstract book,
pp 25 - 26,von Werder,K.,Fahlbusch,R. (eds.) Munich 1983
- 141.Yalow,R.S., Berson,S.A.
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man
J.Clin.Invest. 39 , 1157 (1960)
- 142.Yen,S.S.C., Hoff,J.D., Casley,B.L.,Casper,R.F., Sheehan,K.L.
Induction of prolactin release by LRF and LRF - agonist
Life Sci. 26 : 1963 (1980)
- 143.Zimmerman,E.A.
Oxytocin,Vasopressin and Neurophysins
in: Neurosecretion and brain peptides, pp. 597 - 611
Raven Press,New York (1981)

Lebenslauf

Ich wurde am 8. März 1955 als Sohn des Zahnarzteehepaares Dr. med. dent. Norbert Nechwatal und seiner Gattin Dr. med. dent. Inge Nechwatal, geborene Wiehem, in Kronach, Oberfranken, geboren. Nach dem Besuch der Volksschule war ich Schüler des Kaspar - Zeuß - Gymnasiums Kronach, das ich 1974 mit dem Abitur verließ. Von 1975 - 76 arbeitete ich als Zivildienstleistender bei der Johanniter - Unfall - Hilfe München. Danach nahm ich ein Auslandsstudium auf und studierte zunächst Französisch und Biologie sowie ein Semester Medizin an der Université Scientifique et Medicale in Grenoble, Frankreich. Im Frühjahr 1979 erhielt ich die Zulassung zum Medizinstudium an der Freien Universität Berlin, wo ich auch das Physikum ablegte. 1981 wechselte ich an die Ludwig Maximilian Universität München. Im Sommer 1982 begann ich mit den Arbeiten zur vorliegenden Dissertation. Während des praktischen Jahres war ich sechs Monate in San Francisco und in Boston, USA, in den Tertialen Innere Medizin und Chirurgie. Im November 1985 beendete ich mein Studium mit dem dritten Abschnitt der ärztlichen Prüfung und erhielt die Approbation im Dezember 1985.

